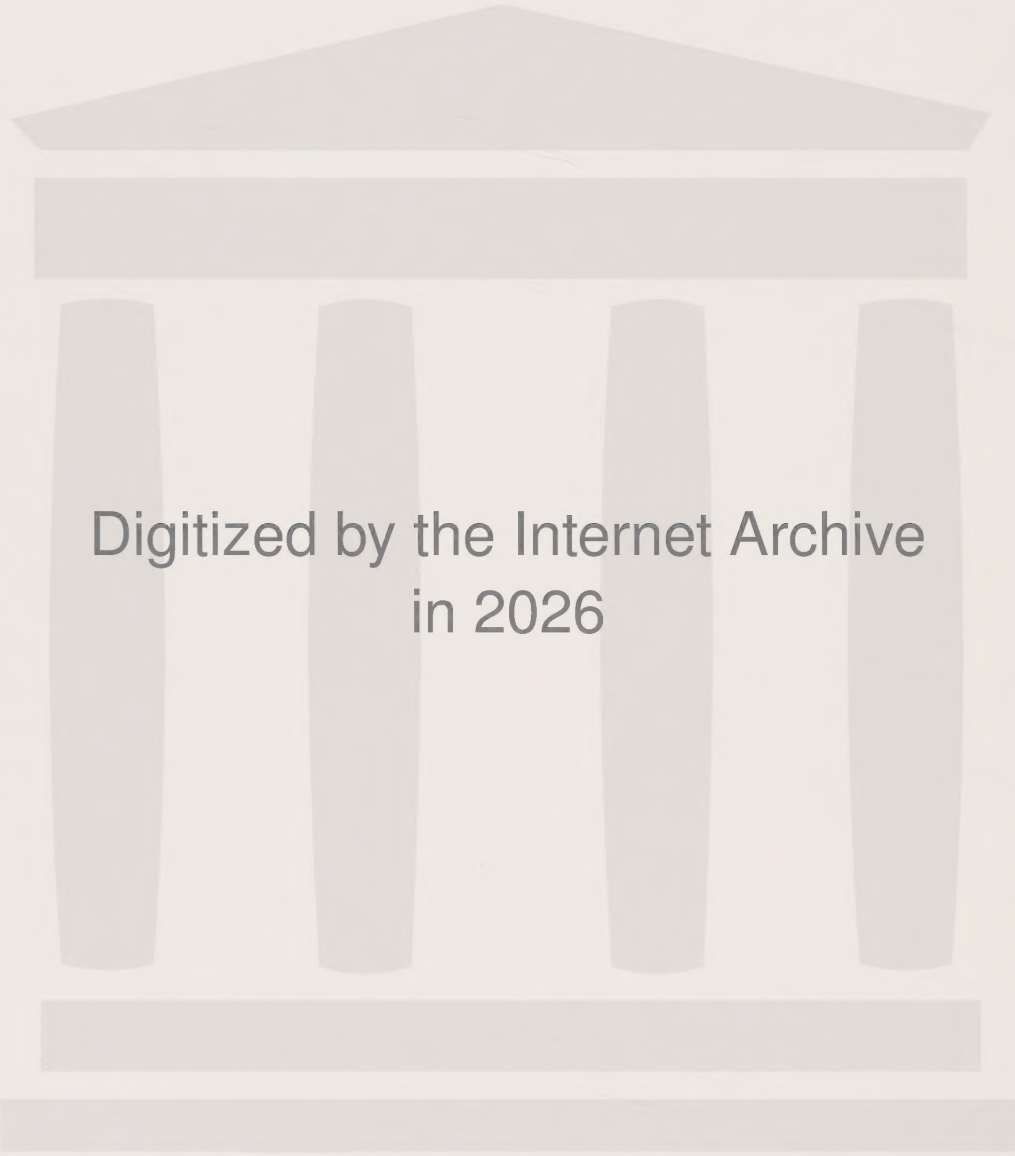


Untersuchungen zum
EMBRYOTOXISCHEN WIRKPRINZIP VON
CYCLOPHOSPHAMID

Hans-Jürgen Schrörs

Düsseldorf 1979

1980



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41548220_0013

Aus dem Institut für Humangenetik und Anthropologie
der Universität Düsseldorf

(Direktor: Prof. Dr. G. R ö h r b o r n)

Untersuchungen zum

EMBRYOTOXISCHEN WIRKPRINZIP VON

CYCLOPHOSPHAMID

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

Der Medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Hans-Jürgen Schrörs

1979



Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität Düsseldorf

Der Dekan
der Medizinischen Fakultät
der Universität Düsseldorf

gez.:
Prof. Dr. Krüskemper

Referent

gez.:
Prof. Dr. Röhrborn

Korreferent

gez.:
Prof. Dr. Wirth

I N H A L T

	<u>Seite</u>
1. EINLEITUNG	5
2. PHARMAKOLOGIE VON CYCLOPHOSPHAMID	7
3. TERATOGENE UND EMBRYOTOXISCHE EIGENSCHAFTEN VON CYCLOPHOSPHAMID - LITERATURÜBERSICHT -	12
4. EMBRYONALENTWICKLUNG DES KANINCHENS (0. - 12. TAG)	19
5. AUFBAU UND FUNKTION DER DOTTERSACKWAND	21
6. ZUSAMMENSETZUNG DES KEIMANLAGENMATERIALS	
6.1 pH	23
6.2 Elektrolyte	24
6.3 Eiweiß	25
6.4 Glukose und Lactat	25
6.5 Aktivität der alkalischen Phosphatasen	26
6.6 Freie Aminosäuren	27
7. FRAGESTELLUNG UND VERSUCHSPLANUNG	28
8. MATERIAL UND METHODE	
8.1 Tierstamm, Tierhaltung und Behandlungstermin	31
8.2 VERSUCHSSERIE I - Teratologische Untersuchungen nach intravenöser Applikation von Cyclophosphamid	31
8.3 VERSUCHSSERIE II - Standardisierung der Narkose und Beatmungstechnik	33
8.4 VERSUCHSSERIE III - Untersuchungen des mütterlichen Blutes und der Dottersackflüssigkeit nach i.v. Appli- kation von Cyclophosphamid	
8.4.1 Übersicht	35
8.4.2 Probengewinnung	36
8.4.3 Bestimmung von Normalwerten	41
8.4.4 Untersuchungen nach intravenöser Applikation von CP im Vergleich zur Kontrolle	41
8.4.5 Labormethoden	
8.4.5.1 pH und Blutgase	42
8.4.5.2 Natrium, Kalium und Calcium	43
8.4.5.3 Gesamteiweiß	44
8.4.5.4 Glukose	45
8.4.5.5 Lactat	45
8.4.5.6 Aktivität der alkalischen Phosphatasen	47
8.4.5.7 Freie Aminosäuren	48

8.5	Statistische Bearbeitung	
8.5.1	Mittelwert und Standardabweichung	53
8.5.2	Versuchsserie I	
8.5.2.1	t-Test (Vergleich von Mittel- werten	53
8.5.2.2	2 mal 2 Felder χ^2 (Chi-Quadrat)- Test	54
8.5.3	Versuchsserie II und III	
8.5.3.1	Rangsummentest zum Vergleich von Mittelwerten	55
8.5.3.2	F-Test zum Vergleich von Vari- anzen	56
8.5.3.3	Wilcoxon-Test für Paardifferenzen Vergleich von verbundenen Stich- proben	56

9. ERGEBNISSE

9.1	Übersicht	58
9.2	VERSUCHSSERIE I - Teratologische Untersuchungen nach intravenöser Applikation von Cyclophosphamid	59
9.3	VERSUCHSSERIE II - Standardisierung der Narkose und Beatmungstechnik	66
9.4	VERSUCHSSERIE III - Untersuchungen des mütterlichen Blutes und der Dottersackflüssigkeit nach i.v. Appli- kation von Cyclophosphamid	
9.4.1	Versuch III/N - Normalwerte	69
9.4.2	Untersuchungen nach Gabe von Cyclophospha- mid und physiologischer NaCl-Lösung	
9.4.2.1	Versuch III/CP ₁ und III/NaCl ₁ - 1 Stunde nach Applikation	75
9.4.2.2	Versuch III/CP ₃ und III/NaCl ₃ - 3 Stunden nach Applikation	82
9.4.2.3	Versuch III/CP ₆ und III/NaCl ₆ - 6 Stunden nach Applikation	88
9.4.2.4	Versuch III/CP ₁₂ und III/NaCl ₁₂ - 12 Stunden nach Applikation	93

10. DISKUSSION

10.1	VERSUCHSSERIE I - Teratologische Untersuchungen nach intravenöser Applikation von Cyclophosphamid	104
10.2	VERSUCHSSERIE II - Standardisierung der Narkose und Beatmungstechnik	106
10.3	VERSUCHSSERIE III - Untersuchungen des mütterlichen Blutes und der Dottersackflüssigkeit nach i.v. Appli- kation von Cyclophosphamid	
10.3.1	Übersicht	110
10.3.2	pH und Blutgase	
10.3.2.1	Normalwerte	111
10.3.2.2	Veränderungen nach Applikation von CP	112

10.3.3	Natrium, Kalium und Calcium	
10.3.3.1	Normalwerte	114
10.3.3.2	Veränderungen nach Applikation von CP	115
10.3.4	Gesamteiweiß	
10.3.4.1	Normalwerte	119
10.3.4.2	Veränderungen nach Applikation von CP	120
10.3.5	Glukose	
10.3.5.1	Normalwerte	121
10.3.5.2	Veränderungen nach Applikation von CP	122
10.3.6	Lactat	
10.3.6.1	Normalwerte	123
10.3.6.2	Veränderungen nach Applikation von CP	124
10.3.7	Aktivität der alkalischen Phosphatasen	
10.3.7.1	Normalwerte	124
10.3.7.2	Veränderungen nach Applikation von CP	126
10.3.8	Freie Aminosäuren	
10.3.8.1	Normalwerte	127
10.3.8.2	Veränderungen nach Applikation von CP	129
10.4	Zusammenfassende Diskussion	132
11.	ZUSAMMENFASSUNG	136
12.	ANHANG (TABELLEN - ABBILDUNGEN ZU VERSUCHSSERIE III)	139
13.	LITERATUR	159

1. E I N L E I T U N G

Die Verordnung von Pharmaka bei schwangeren Frauen muß besonders sorgfältig abgewogen werden. Es ist bekannt, daß chemische Substanzen Fehlbildungen erzeugen können, auch wenn sie nicht bis zum Embryo vordringen (*Lloyd et al.*, 1974).

Bei der Erforschung solcher indirekter, keimschädigender Mechanismen müssen neben den Stoffwechselverhältnissen im mütterlichen Organismus auch die metabolischen Vorgänge in der Umgebung der Keimanlage beachtet werden.

Dabei ist es schwierig zu beurteilen, ob eine Substanz primär den Embryo schädigt, oder ob es zunächst zu Stoffwechselveränderungen in der ihn umgebenden und ernährenden Flüssigkeit kommt, die dann indirekt schädigend auf den Keim einwirken. Bei Pharmaka, die nach mütterlicher Applikation mit ihren Metaboliten nicht im Embryo nachweisbar sind, aber embryotoxische Wirkungen zeigen, müssen indirekte Wirkmechanismen diskutiert werden.

Das Zytostatikum Cyclophosphamid (CP) ist eine Substanz, über deren embryotoxische und teratogene Wirkung seit der Entdeckung (*Arnold und Bourseaux*, 1958) zahlreiche Autoren veröffentlicht haben, deren "keimschädigendes Wirkprinzip" aber unklar ist.

Ursache hierfür sind zum einen der komplizierte, zum Teil noch ungeklärte Metabolismus von CP, zum anderen die geringen Kenntnisse über Entstehungsmechanismen exogen oder endogen verursachter Mißbildungen.

Da man davon ausgehen kann, daß unverändertes CP selbst nicht embryotoxisch wirkt (*Krengel, Diss. in Vorbereitung*), und Hinweise dafür bestehen, daß einige aktive Metabolite kaum in der Lage sind, im Gegensatz zum CP selber, beim Kaninchen am 9. Tag der Gestation bis zum Embryo vorzudringen (*ebenfalls Krengel, Diss. in Vorbereitung*), ist möglicherweise eine direkte Beeinflussung des Embryos nicht gegeben.

Es müssen somit auch indirekt wirkende Mechanismen für die Keimschädigung untersucht werden.

Da sich der Kaninchenembryo über einen gewissen Zeitraum von der Dottersackflüssigkeit ernährt, wäre es denkbar, daß Veränderungen in der Zusammensetzung dieser Flüssigkeit für die embryotoxische und teratogene Wirkung von CP mitverantwortlich sind.

In der vorliegenden Arbeit sollte geprüft werden, bei welchen Dosen CP am 9. Tag der Gestation beim Kaninchen embryotoxische Wirkungen zeigt. Weiterhin wurde die Frage gestellt, ob eine embryotoxische Dosis dieser Substanz in der Lage ist, die Zusammensetzung der Dottersackflüssigkeit in vivo zu beeinflussen.

2. PHARMAKOLOGIE VON CYCLOPHOSPHAMID

Das Zytostatikum Cyclophosphamid (CP) ist ein zyklischer N-Phosphamidester des Bis-(β -chloräthyl)-amins und wurde von *Arnold und Bourseaux (1958)* erstmalig beschrieben.

Mit dieser Substanz ist das Prinzip der "Transportform-Wirkform" auf die Gruppe der N-Lost-Verbindungen übertragen worden. Das hoch toxische N-Lost liegt im CP in einer nicht aktiven Transportform vor. Erst im Säugerorganismus wird es in die aktive Form zurückgebildet.

Hierdurch konnte der therapeutische Index, als Maß der therapeutischen Breite, für N-Lost auf das Vielfache gesteigert werden (*Brock, 1963*).

Der genaue Metabolismus des CP ist noch nicht in allen Einzelheiten vollständig geklärt. Folgende Abbauege können zum Teil als gesichert angesehen werden (siehe auch Abb. 1):

CP (I) wird in den Mikrosomen der Leber enzymatisch durch eine gemischt-funktionelle Oxydase oxydiert; Cofaktoren sind molekularer Sauerstoff und NADPH (*Brock und Hohorst, 1963; Roth, 1974*).

Das entstehende 4-Hydroxy-cyclophosphamid (IIa) steht mit seinem Tautomer, dem Aldophosphamid (IIb), im Gleichgewicht.

Aus diesen Verbindungen können 4 Keto-cyclophosphamid (IV) und Carboxyphosphamid (III) durch eine Aldehyddehydrogenasereaktion entstehen.

Takamizawa et al (1972) konnten diese beiden Metabolite nach Gabe von CP als Ausscheidungsprodukt im menschlichen Urin nachweisen. Weitere Untersuchungen dieser Autoren lassen vermuten, daß wahrscheinlich keine der beiden Substanzen Vorstufe der anderen ist. 4 Keto-cyclophosphamid und Carboxyphosphamid entstehen vermutlich unabhängig voneinander.

In diesem Zusammenhang fand *Sladek (1973 a)*, daß Aldophosphamid als alkylierend wirksames, instabiles Aldehyd durch eine Aldehydoxydase und/oder durch eine NAD-verbundene Aldehyddehydrogenase-Reaktion zu Carboxyphosphamid inaktiviert wird.

Colvin et al. (1973) konnten N-Lost-Phosphorsäurediamid (V) als weiteren Metaboliten von CP in vitro nachweisen, nachdem sie radioaktiv markiertes

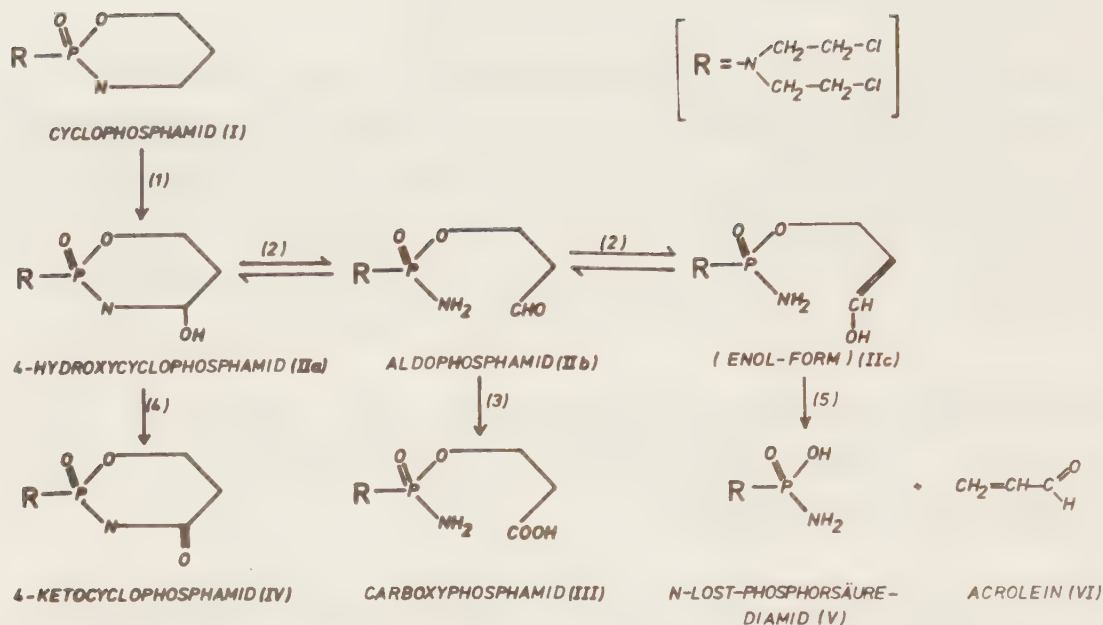


Abbildung 1 - Abbaumöglichkeiten von Cyclophosphamid; (1) = enzymatische Oxydation in den Mikrosomen der Leber, (2) = Gleichgewichtsreaktion, (3) = enzymatische Oxydation durch Aldehyddehydrogenase, (4) = Reaktion wie (3), (5) = chemische Reaktion

CP mit Mäuselebermikrosomen inkubiert hatten. Die Autoren vermuteten, daß diese, als stark toxisch bekannte Verbindung, aus 4-Hydroxy-cyclophosphamid, bzw. aus Aldophosphamid unter Abspaltung von Acrolein (VI) entsteht (siehe Abb. 2).

Hohorst et al. (1976) und Draeger et al. (1976) diskutierten einen weiteren Abbauweg des 4-Hydroxy-cyclophosphamid. Nach Ansicht dieser Autoren kann 4-Hydroxy-CP nach seiner Bindung an Sulfhydrylgruppen von Proteinen zu Thio-derivaten reagieren. Dieser Reaktionsweg scheint, im Vergleich zum direkten Abbau von 4-Hydroxy-CP (siehe Reaktion (2) in Abb. 1), quantitativ bedeutungsvoller zu sein. Unter physiologischen Bedingungen kann, allerdings verzögert, wieder N-Lost-Posphorsäurediamid entstehen.

Die Bildung von N-Lost-Phosphorsäurediamid, als auch von Acrolein als toxische Abbauprodukte des CP kann als gesichert angesehen werden.

Fensleau et al. (1975) wiesen Phosphorsäurediamid qualitativ als Metaboliten von CP im Urin des Menschen nach. *Jadine et al.* (1976) gelang der quantitative Nachweis.

Acrolein konnte bereits von *Alacron und Meienhofer* (1971) als Abbauprodukt von CP nachgewiesen werden.

Alacron (1976) zeigte außerdem, daß nach Gabe von CP beim Menschen und bei der Ratte 3-Hydroxypropylmercaptursäure (= MCA oder 3-Hydroxypropyl-L-Cystein) gebildet werden kann. Interessant dürfte besonders im Rahmen dieser Untersuchungen sein, daß MCA bei der Ionenaustauschchromatographie im Aminosäureanalysator ca. 30 Minuten nach Serin und ca. 15 Minuten vor Glutaminsäure, also zum Zeitpunkt des Prolins, eluiert werden soll. Bei hohen Konzentrationen kann nach Angaben von *Alacron* (s.o.) der MCA-Peak den des Prolins vollständig überdecken.

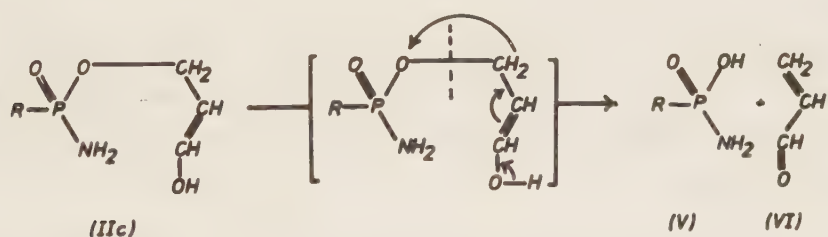


Abbildung 2 - Möglicher Reaktionsmechanismus der Acroleinabspaltung (nach Angaben von *Connors et al.* (1974)); aus der Enolform des Aldophosphamid (IIc) entsteht N-Lost-Phosphorsäurediamid (V) und Acrolein (VI).

Auf der Suche nach weiteren Metaboliten von CP wiesen *Cox und Levin* (1975) drei weitere Abbauprodukte dünnschichtchromatographisch, und *Schaumloeffel et al.* (1975) zwölf bis dahin unbekannte Metabolite radiochromatographisch nach. Die pharmakologische Bedeutung dieser Substanzen ist allerdings noch nicht hinreichend bekannt.

Nach Entdeckung neuer Abbauprodukte werden von allen Autoren auch deren zytotoxischen Eigenschaften geprüft oder diskutiert.

CP selber ist praktisch inaktiv. Während zum Beispiel 0,5 ug/ml N-Lost-Phosphorsäurediamid ausreichen, um 75% einer Zellkultur absterben zu lassen, müssen 400 ug/ml, also das 800-fache an CP gegeben werden, um den gleichen Effekt zu erzielen (*Connors et al.*, 1974).

Die zytotoxische Aktivität und die antitumoralen Eigenschaften der einzelnen CP-Metabolite scheinen sehr unterschiedlich zu sein.

Während 4-Keto-cyclophosphamid und Carboxyphosphamid in vivo nur sehr geringe, in vitro gar keine zytotoxischen Effekte zeigen (*Takamizawa et al.*, 1972; *Dold und Gaertner*, 1972; *Sladek*, 1973 b), werden 4-Hydroxy-cyclophosphamid, sowie den Spaltprodukten N-Lost-Phosphorsäurediamid und Acrolein starke alkylierende und zytotoxische Eigenschaften zugeschrieben (*Alacron et al.*, 1972; *Takamizawa et al.*, 1972; *Hill et al.*, 1972; *Sladek*, 1973 b; *Colvin et al.*, 1973; *Hohorst et al.*, 1976).

CP verursacht weiterhin nach i.p. Gabe bei jungen männlichen C₃H-Mäusen Mutationen in den Keimzellen (Spermatozyten und Spermatogonien), was nach Paarung mit weiblichen Tieren zu einer Vermehrung der abgestorbenen Implantate führt (*Röhrborn und Vogel*, 1967).

Die entscheidende Reaktion im Abbau des CP ist die initiale enzymatische Oxydation in den Mikrosomen der Leberzellen. Durch Hemmung oder Stimulation der mikrosomalen Enzyme läßt sich die Produktion der Metabolite verlangsamen oder beschleunigen.

Zur Aktivierung kann unter anderem Phenobarbital herangezogen werden (*Gibson und Becker*, 1971; *Murthy et al.*, 1973).

Die Metabolisierung wird durch Hexobarbital, Testosteron, Cortisol, Cytochrom c, Stickstoff und Kohlenmonoxyd (*Roth*, 1974), sowie durch Cystein (*Stekar*, 1973) gehemmt. Weitere Inhibitoren der oxydativen enzymatischen Reaktion sind Nicotin, Atropin, Ephedrin, Apomorphin und Cocain (*Hill et al.*, 1972).

Vergleichende Untersuchungen über die Pharmakokinetik des CP im menschlichen Organismus und beim Versuchstier wurden von *Dold und Gaertner* (1972) vorgelegt.

Danach beträgt die Halbwertszeit ohne Vorbehandlung beim Menschen 285 Minuten, beim Kaninchen 30 Minuten. Während beim Menschen nach 20 Stunden keine aktiven Substanzen mehr nachgewiesen werden konnten, betrug diese Zeit beim Kaninchen nur etwa 4 Stunden. Die höchste Konzentration aktiver

Metabolite wurde beim Menschen nach 120 - 240 Minuten, beim Kaninchen nach 30 Minuten gefunden. Etwa 30% unverändertes CP wurde sowohl beim Menschen, als auch beim Kaninchen im Urin ausgeschieden.

Im Gegensatz zum Kaninchen entstehen im menschlichen Organismus nach Gabe von hohen Dosen CP keine proportionalen Konzentrationen an Metaboliten. Die metabolische Umwandlung in der Leber ist zumindest beim Menschen ein limitierender Faktor. Wird eine bestimmte Sättigung erreicht, werden keine weiteren Metabolite mehr umgesetzt. Die Autoren sprachen in diesem Zusammenhang von einem Zytostatikum mit "automatischer Notbremse".

Es zeigte sich, daß beim Kaninchen im Gegensatz zum Menschen die Konzentration der Metabolite schneller ansteigen und nach kürzerer Verweildauer im Organismus wieder ausgeschieden werden.

Der prozentuale Anteil von CP, der in Metabolite umgewandelt wird, ist bei beiden Species gleich (*Dold und Gaertner, 1972*).

3. TERATOGENE UND EMBRYOTOXISCHE EIGENSCHAFTEN VON CYCLOPHOSPHAMID - LITERATURÜBERSICHT -

Die ersten Untersuchungen über die Teratogenität von CP begannen schon wenige Jahre nach der Entdeckung.

Die Ergebnisse schwanken unter verschiedenen Versuchsbedingungen zwischen "nicht teratogen", "teratogen" und "embryoletal". Aus diesem Grund muß bei der Interpretation besonders auf Applikationszeitpunkt, Applikationsart, Dosis und Tierspecies geachtet werden.

Aus der nachfolgenden Literaturübersicht (siehe Tabelle 1) sollen an dieser Stelle drei Untersuchungen besonders herausgehoben werden.

Gottschewski (1963) fand beim Kaninchen nach Applikation von 40 mg CP/kg Körpergewicht am 9. Tag der Gestation Mißbildungen an der Wirbelsäule.

Fritz und Hess (1971) konnten dagegen beim gleichen Versuchstier nach Applikation von 30 mg CP/kg KG am 9. Tag der Schwangerschaft keine Mißbildungen finden. Allerdings war die Resorptionsrate gegenüber der Kontrolle erhöht. Die Mißbildungsrate zeigte nur nach Behandlung am 7.d.p.c. und zwischen dem 11. und 14. d.p.c. eine Erhöhung.

Clavert (1972) beobachtete beim Kaninchen ebenfalls zwei Häufigkeitsgipfel der Mißbildungsrate. Das mißbildungsfreie Intervall lag zwischen dem 8. und 12. Tag der Gestation. Der Autor berücksichtigte jedoch in seinen Untersuchungen nur Fehlbildungen der Augen.

Tabelle 1 - Literaturübersicht über teratogene und embryotoxische Eigenschaften von Cyclophosphamid (1962 bis 1977)

(Miß = Mißbildungsrate, Res = Resorptionsrate, Hypo = Hypoplasien, bLM = bilaterale Mißbildungen, ulM = unilaterale Mißbildungen, Ex = Extremitäten, Sch = Schnabel, A = Augen, Sw = Schwanz, H = Herz, Gs = Gesicht, So = Somiten, O = Ohren, N = Nase, Ka = Kopfanlage, Be = Becken, Ha = Haut, Or = Organe, Ki = Kiefer, Ws = Wirbelsäule, R = Rippen, St = Sternum, Gh = Gehirn, Hs = Hirnschädel, Z = Zähne, Os = Ossifikationsstör.)



T A B E L L E 1

AUTOR	JAH	SPECIES	DOSIS	APPL.	APPL.ZEIT	ERGEBNISSE
GERLINGER et al	1962	Huhn	1/10mq/Ei	DS	vor d.Behr- tung	am 11.Tag: 60% tot.Fet. 34% Miß. (Hypo, Ex,Sch,A,Sw,H); am 14.Tag: 77% tot.Fet. 20% Miß. (Ex,sonst keine typ.Miß);
GOTTSCHESKI	1963	Kanin.	10 und 40 mq/kg	i.v.	19,20,27,28 Std.p.c. 3.-9.d.p.c.	5.-9.d.p.c.: 38 - 50% Res. 71 - 77% Miß. vor dem 2,5.d.p.c. (So, im Bereich des Vorderfeldes; 5.-7.d.p.c. (Gs); 7.-9.d.p.c. (Ex,So); 9.-9,5.d.p.c. (Sw);
GOTTSCHESKI u.ZIMMERMANN	1963	Kanin.	40 mq/kg	i.v.	Blastone- nese; Embryo- genese	phasenspezifische Wirk.: vor d.6.d.p.c. (Hs,Ka); 6.-9.d.p.c. (A,O,N,So,Ex, Sw; blM); nach d.9.d.p.c. (Or; ulM);
KRAHE	1963	Ratte	"gewichts- adäquate, therap.Ein- zeldosen"	i.v.	1. u. 2. Schwanger- schafts- hälfte	Gewichtsverminderung; keine Mißbildungen;
GERLINGER	1964	Kanin.	50,100, bzw. 300 mq/die (an 4 Tagen)		10.-13. d.p.c.	50 mq/die (Ex,Gau,O,Hypo) 100 u. 300 mq/die : 100% Res.
GERLINGER et al	1964	Kanin.	2,10,20,50 mq/die an 4 Tagen	?	10.-13. d.p.c.	nur Entw.d.Gonaden disc. 2,10 u.20 mq/die (norm. Entw.d.Gonaden u.Gonozyt.); 50 mq/die (hypotroph.Gon.; Vermind.d.Gonoz. bei weibl. Fet. um 96%, bei männl.Fet. um 94%);
GREENBERG u. TANAKA	1964	Mensch (Fall- bericht)	zw.15 u.100 mq/die	oral, i.v.	Therapie- beginn: z.Z. der Konzent. Intensiv.: 6.-7.SS-Wo.	männl.,multipel mißgeb. Frühgeburt (1,9 kg) (Ex,Gau,N,O); normaler Karyotyp;
WILSON	1964	Patte	2,5, 5 u. 10 mq/kg	?	9.d.p.c.	dosisabh.Steig.d. Pes.u. Miß. : Res. - 5 - 55% Miß. - 1 - 26% Kontrolle: 3,6% Res,1% Miß. (Ch,A,G)
ANGEL	1965	Ratte	3, bzw.10 mq/die	i.v.	1. u. 2. Schwanger- schafts- hälfte	3 mq/die (1.SS-Hälfte): ca.60% Res, keine Miß; Reduz.d.Wurfgröße; Fer- tilitätsstör.d.Junqtiere; 3 mq/die (2.SS-Hälfte): ca.35% Res, keine Miß; Fertilitätsstör.d.Junqt.; 10 mq/die (2.SS-Hälfte): 100% Res;

T A B E L L E 1 (Forts.)

AUTOR	JAH	SPECIES	DOSIS	APPL.	APPL.ZEIT	ERGEBNISSE
GERLINGER u. CLAVERT	1965a	Kanin.	50mg/die an 4 Tagen	s.c. d.p.c.	10.-13.	(siehe Gerlinger et al 1964); Anzahl d.Gonozyt. vermehren sich nach d. Geburt wieder;
GERLINGER u. CLAVERT	1965b	Kanin.	50mg/die an 4 Tagen	s.c. d.p.c.	10.-13.	Vermind.d.Gonozyten (siehe Gerlinger u. Clavert 1965a) Entwicklungshemmungen u. Miß (Hypo, Ki, Gau)
HACKENBERG u. v. KREYBIG	1965	Maus	10,20 u.40 mg/kg	i.p. d.p.c.	9.-13.	<u>10 mg/kg (9.d.p.c.):</u> 50% Res, keine Miß, Gewichtsvermind.; <u>10 mg/kg (10.d.p.c.):</u> 50% Res, 37% Miß (Ex, Sw, Gh); <u>20 mg/kg (9./10.d.p.c.):</u> 100% Res. <u>20 mg/kg (11.d.p.c.):</u> 13% Res, 87% Miß (Ch, Ka, A, Ex, Ws, R, St); <u>20 mg/kg (12.d.p.c.):</u> 100% Miß (Ex, Ws); <u>20 mg/kg (13.d.p.c.):</u> keine Fehlentwicklungen; <u>40 mg/kg (11.d.p.c.):</u> prakt. keine Fehlentw. (nur ein mißgeb. Fet);
v. KREYBIG	1965a	Ratte	5,10,20,40 mg/kg	i.p. i.v.	11.-15. d.p.c.	(nur Extremit. Miß. disc.) steigende Dosis, steigende Mißbildungsrate; frühe Appl. bringt stärkere Miß.;
v. KREYBIG	1965b	Ratte	2,5 ,5,10, 20,40 mg/kg	i.p. i.v.	11.-15. d.p.c.	niedrige Dosis - norm. Entw. hohe Dosis - letal "Alls oder Nichts" -Effekt <u>12.d.p.c.:</u> (Ch, Ex, Sk) <u>13.d.p.c.:</u> (Ch, Ex!, Sk) <u>14.d.p.c.:</u> (Ch, Ex) <u>15.d.p.c.:</u> (geringe Miß, Gau)
SHOJI u. OHZU	1965	Maus	25 mg/kg u. über 50 mg/kg	? ?	? ?	<u>25 mg/kg:</u> keine Miß; <u>über 50 mg/kg:</u> Ausbildung von Anomalien
v. KREYBIG	1966	Ratte	10 mg/kg	? ?	13.d.p.c.	Substanzspezifisches Mißbildungssyndrom; CP besitzt keine desmocraniotrope Wirkungskomponente;
v. KREYBIG u. SCHMIDT	1966	Ratte	5,10,20 mg/kg	i.p. i.v.	13.d.p.c.	<u>5 mg/kg:</u> 6% Res, keine Miß; <u>10 mg/kg:</u> 3% Res, 86% Miß (Or, Hs, Gh); <u>20 mg/kg:</u> 59% Res, 41% Miß (Or, Hs, Gh)
CHAUBE et al	1967	Ratte	2,5 ,5,7, 10,15,40 mg/kg	? ?	3.-12. d.p.c.	zwei Gipfel in der Resorptionsrate: 1.) zw. 4. u. 6. d.p.c.; 2.) zw. 9. u. 11.d.p.c.;

T A B E L L E 1- (Forts.)

AUTOR	JAHR	SPECIES	DOSIS	APPL.	APPL.ZEIT	ERGEBNISSE
CAUBE et al (Forts.)	S.O.	S.O.	S.O.	S.O.	S.O.	bis zum 10.d.p.c. keine Miß; <u>7 mg/kg (11./12.d.p.c.):</u> 35% Miß <u>10mg/kg (12.d.p.c.):</u> 100% Miß (Ch,Ex,Sw,Gau,Or)
v.KREYBIG u.SCHMIDT	1967	Patte	20 u.40 mg/kg	i.p.	15. u.16. d.p.c.	<u>20 mg/kg:</u> Entwicklungsverz. erst nach 24 Std erkennbar; (zytolog.Veränd.im mesen- chymalen Geweben) <u>40 mg/kg:</u> 2 - 3 Tage nach Appl. 100% tote Feten; Entwicklungsstörungen bereits innerhalb von 24 Stunden; Behandlungen am 14. u.15. d.p.c. zeigen ähnl.Ergeb.
GIBSON u. BECKER	1968	Maus	5,10,20 mg/kg	i.p.	9.-14. d.p.c.	<u>5 u.10 mg/kg:</u> erhöhte Re- sorptionsrate, keine Miß; <u>20 mg/kg:</u> biphasische Kurve der fetalen Mortalität - 1.) 9.d.p.c. 2.) 13.d.p.c. Miß (Ex,Sk,Sw,Gau,Λ,Or)
SCHREINER u.v.KREYBIG	1968	Patte	10,20,40 mg/kg	i.p.	12.-15. d.p.c.	(nur Gesichts- u.Ohrenmiß. disc.) <u>10 u.20 mg/kg (12.-15.d.p.c.):</u> charakt.Miß; keine Innenohr- schäden; <u>40 mg/kg (14.d.p.c.):</u> gesteig. Pes, schwerste Miß, keine Innenohrschäden - ledigl. Hypoplasien;
NORDLINDER	1969	Maus	0,04 u. 0,20 mg/ Tier	s.c.	kurz nach d.Geburt	verzögertes Wachstum; Fehlbgd. (Ex,De), verkürz- te Nasen;
GEBHARDT	1970	Maus	10 u.20 mg/kg	i.p.	1.-14. d.p.c.	zwei Gipfel in der Embryo- lethalität: 1.) 3.d.p.c. 2.) 8./9.d.p.c. bei 20 mg/kg höhere Pes. als bei 10 mg/kg; <u>20 mg/kg:</u> (Ex,Os) <u>10 mg/kg:</u> keine Miß;
BERRY	1971	Ratte	150 mg/kg Einzel- dosis; 3 mg/kg an 3 Tagen	i.p.	vor d.Pu- pertät	keine Fertilitätsstör. bei den behand.Junqtieren Paarung erfolgte 3 - 6 Mo- nate nach CP - Appl.; Nachkommen keine Miß., aber vermind. Größe;

T A B E L L E 1 (Forts.)

AUTOR	JAHR	SPECIES	DOSIS	APPL.	APPL.ZEIT	ERGEBNISSE
FRITZ u. HESS	1971	Kanin.	30 mg/kg	i.v.	6.-14.d.p.c.	absteigender Verlauf d. Resorptionsrate: Max. (6.d.p.c.) 42 % Min. (14.d.p.c.) 0 % biphasischer Verlauf d. Mißbildungsrate: 1.) 7.d.p.c. (9%) 2.) 12.d.p.c. (100%) Am 8. und 9.d.p.c. (0%) (A,Ka,Ch,Gau,Ex,Hs) biphasischer Verlauf des Geburtsgewichtes: 1.Minimum - 7.d.p.c. 2.Minimum -11. - 14.d.p.c. (9.u.p.c.): 16% Res., 0% Miß. Gewicht - 35,8 g)
GEBHARDT	1971	Maus	10 u.15 mg/kg	?	11. u.12. d.p.c.	Häufigkeit der Miß ist dosisabhängig; 11.d.p.c.: (Gau,Ex) 12.d.p.c.: (Gau,Ex)
SINGH	1971	Ratte	2-5,8-10, 15-30 mg/ kg	i.p.	8.,10.,15. d.p.c.	8.d.p.c.: 97% Res, 0% Miß; 10.d.p.c.: 100% Res; 15.d.p.c.: 3% Res, 100% Miß; (A,Gh,Sw,Ex,G)
SINGH et al	1971	Huhn	0,005 - 0,2 u. 0,035 - 0,08 mg/Ei	DS	1.-6.Tag d. Inkubation	mit steigender Resorptions- rate sinkt die Mißbildungs- frequenz; Miß. (Sch,A,Ex,Ws,Hs)
TOLEDO et al	1971	Mensch Fallbe- richt	560 mg/die an 4 Tagen 100-150 mg währ. 2 Mo- nate	i.v.	Therapie- beginn: 6,5 Wochen nach SS-Beginn;	Abort eines mißgeb.Feten im 6. SS-Monat; (2.-6. SS-Woche - röntgenol. Untersuchung, ca. 5-25 P);
CLAVERT	1972	Kanin.	30 mg/die an 4 Tagen	i.v.	6.-9.,8.-12., (nur Augenmiß. disc.) 10.-13. u. 12.-15. d.p.c.	zwei Gipfel in der Häufig- keit für Augenmißbldg. 1.) 6.-9.d.p.c. (6%) 2.) 10.-13.d.p.c. (22,5%) (8.-12.d.p.c. (0%));
HEINECKE u. KLAUS	1972	Maus	5 - 10 u. 10- 30 mg/kg	i.p.	7.-11.d.p.c.	(nur das Auftreten akzess. Rippen disc.) nach CP u. anderer N-Lost- derivate vermehrtes Auftre- ten akzess. Rippen;
KLOPPENBURG	1972	Ratte	4,5,6 mg/kg		11. u.12. d.p.c.	dosisabhängige Erhöhung d. Resorptionsrate; Miß. (Ws,R,St,Ex)
SCHMITZ et al	1972	Ratte	10 u. 20 mg/kg	i.p.	12.-18. d.p.c.	12.-18.d.p.c.: abnehmende Res, sporadisch auftret. Miß.; Mißbildungsrate an allen Tagen und mit allen Dosen 100% (Hs,A,Z,Os,Ki,Ex,Ch,Gau)

T A B E L L E 1 (Forts.)

AUTOR	JAHR	SPECIES	DOSIS	APPL.	APPL.ZEIT	ERGEBNISSE
STEKAR	1973	Ratte	20 mg/kg	s.c.	4 Tage nach d. Geburt	Auftreten von Ohrenmißbldg. mit Schwerhörigkeit; Nierenzysten; Wachstums- hemmung;
SINGH u. RAJU	1974	Ratte	8,10,12, 15,18,20 mg/kg	1.p.	12.,13. u. 14. d.p.c.	dosisabhängige Mißbildungs- rate; Miß (Ws,Gh,Or)
SANYAL u. SINGH	1974	Ratte	8,10,12, 15,18,20 mg/kg	1.p.	12.,13. u. 14. d.p.c.	(nur Ossifikationsstör. d. Fußes disc.) <u>13./14. d.p.c.:</u> höhere Rate d. Fußmißbildungen als am 12.d.p.c.;
SINGH u. SANYAL	1974	Ratte	8,10,12, 15,18,20 mg/kg	1.p.	12.,13. u. 14. d.p.c.	(nur Mißbldg. d. Vorder- beine disc.) <u>12.d.p.c.:</u> höchste Resorp- tionsrate; <u>12.-14.d.p.c.:</u> Abnahme d. Mißbildungsrate d. Vorder- beine (incl. Clavicula u. Scapula)
SINGH et al	1974a	Huhn	0,05 mg/Ei	DS	5.Tag d. Inkubation	(nur Entwicklungsstör. d. Cerebellums disc.) Mißbildungen u. Größen- reduzierung d. Kleinhirns;
SINGH et al	1974b	Ratte	8,10,12, 15,18,20, 30 mg/kg	1.p.	12.-16. d.p.c.	(nur Extremitätenmißbldg. disc.) <u>12.-14.d.p.c.:</u> Miß an Füßen u. Händen (Ex); <u>15. u.16.d.p.c.:</u> keine Mißbldg. an den Extremitäten
FOERSTER u. LIERSE	1975	Maus/ Ratte	100 mg/kg	1.p.	1.-4.Tag nach d. Ge- burt	Mißbildungen d. Petina bei beiden Species;
MALIK u. SINGH	1975	Huhn	0,05 mg/Ei	DS	0.-5.Tag d. Inkubation	(nur Gehirn disc.) Mißbldg. d. Groß- u. Klein- hirns;
SINGH et al	1975	Huhn	0,04-0,05, 0,035 - 0,05 mg/Ei	DS	3.-6.Tag d. Inkubation	(nur Beinmißbldg. disc.) ein- und beidseitige Bein- mißbldg.;
METHA et al	1976	Maus	5,10,20,30, 40 mg/kg	1.p.	7,5. - 15,5. d.p.c.	<u>5 mg/kg:</u> keine Miß <u>10 mg/kg (7,5.-9,5.d.p.c.):</u> keine Miß; <u>20 mg/kg (11,5.d.p.c.):</u> 87% Miß, 7% Res; <u>30 mg/kg (7,5.-9,5.d.p.c.):</u> 100% Res; <u>30 mg/kg (11,5.-13,5.d.p.c.):</u> 100% Miß (Gau, andere Miß) <u>40 mg/kg (11,5.d.p.c.):</u> 45% Miß, 73% Res;

T A B E L L E 1 (Forts.)

AUTOR	JAHR	SPECIES	DOSIS	APPL.	APPL.ZEIT	ERGEBNISSE
PABST u. WENDLER	1976	Ratte	0,47, 0,94, i.p. 1,8, 3,75, 7,5, 15, 30 mq/kg an 7,8,bzw. 9 Tagen; 15,20,40 mq/kg (Einzeldosis)	i.p.	6.-14.d.p.c. 7.-14. " 8.-14. " 13.d.p.c.	<u>bei d. chronischen Appl.:</u> Dosis-Wirkungsbez.d.Res. über 7,5 mq/kg : 100% Res; geringe Mißbildungsrate (Sw,R,Ex) <u>bei einmaliger Appl.:</u> Dosis-Wirkungsbez.d.MiB. (Ch,A,Ex,Gau,Ws,R,Hs,Ha) <u>Dosiserhöhung:</u> Mißbildungsrate nimmt zu- gunsten d. Resorptionsrate ab;
SINGH u. SANYAL	1976	Ratte	8,10,12, 15,18,20, 30 mq/kg	i.p.	12.-16. d.p.c.	(nur Augenmißbldg.disc.) 13.-15. Tag ist bei d.Ratte als sensibelste Phase zur Erzeugung von Augenmißbldg. anzusehen;
WENDLER et al	1976	Ratte	15 mq/kg	i.p.	15.-19. d.p.c.	MiB (Hs,Gh,Ki,A)
MANSON u. SMITH	1977	Maus	10,15,20 20 mq/kg	i.p.	9.,10.,11. d.p.c.	(nur Beinmißbldg.disc.) <u>9.-11.d.p.c.:</u> Resorptions- rate nimmt bei gleicher Dosis ab; Mißbildungsrate nimmt bei gleicher Dosis zu; Dosis-Wirkungsbeziehung bei d. Res. und bei d. MiB.;

4. EMBRYONALENTWICKLUNG DES KANINCHENS (0. - 12. TAG)

Die Differenzierungsvorgänge während der embryonalen Entwicklung des Kaninchens wurden bisher nur von wenigen Autoren erforscht und beschrieben. Die folgenden Angaben richten sich nach *Seidel (1960)*, *Bleichschmidt (1961)*, *Clara (1966)*, *Gottschewski und Zimmermann (1973)* und *Weber (1974)*.

Die Ovulation wird beim Kaninchen durch den Deckakt mit einer zeitlichen Verzögerung von etwa 10 Stunden provoziert. Die Befruchtung der Eier erfolgt etwa 2 Stunden später. Der Zeitraum zwischen Ovulation und Befruchtung zeigt keine großen individuellen Schwankungen, so daß der Beginn der Schwangerschaft ziemlich genau bestimmt werden kann.

Die Entwicklung der befruchteten Eizelle zur Morula vollzieht sich bis zum 3. Tag der Gestation im Eileiter des Muttertieres. Nach dem Übertritt in den Uterus entwickelt sich die Blastula oder Blastozyste.

Zwischen dem 4. und 6. Tag p.c. (post conceptionem) erfolgt die Nidation, begleitet von einer allgemeinen starken Wachstumsphase, in der sich bestimmte Zellbezirke in einer gesetzmäßigen Reihenfolge und Ordnung verlagern. Nach Abschluß dieses Vorganges, der als Gastrulation bezeichnet wird, ist das Zellmaterial auf drei Etagen verteilt. Je nach ihrer Lage bezeichnet man sie als Ektoderm, Mesoderm und Entoderm. Die Keimanlage besitzt am Ende des 6. Tages einen Durchmesser von etwa 1,3 mm. Die Nidation ist am 7. d.p.c. abgeschlossen.

Zu dieser Zeit wird die Chordaanlage sichtbar; am 8. Tag der Gestation heben sich die ersten Ursegmente ab. Der Durchmesser der Keimscheibe beträgt ca. 3 mm. Während sich in dieser Zeit das sogenannte Faltamnion zu schließen beginnt, erfolgt die Differenzierung der Kopfanlage.

Am 8,5. Tag p.c. verfügt der Kaninchenembryo über 8 - 13 Somiten (= Ursegmente). Während des gesamten 8. Tages erfährt der Keim keine Größenzunahme.

Die Versorgung des Embryos erfolgt in dieser sogenannten histiotrophen Phase über Stoffe, die vom Uterus, teils durch einfache Diffusion, teils durch aktive Transportmechanismen, in die Dottersackflüssigkeit gelangen.

Am 9. Tag der Gestation beginnt die morphologische und histologische Differenzierung der Organanlagen und des Rumpfskeletts. Der Embryo verfügt über 10 - 20 Somiten.

Zu dieser Zeit können Eingriffe in die Differenzierungsvorgänge zum Beispiel Skelettmißbildungen erzeugen. Die Wirbelsäule ist beim Kaninchen am 9. d.p.c. besonders empfindlich.

Nach dem 9. Tag schließt sich das Faltamnion (siehe Abb.8, Seite 40). Gleichzeitig bildet sich der Dottersackkreislauf vollständig aus. Der Dottersack hat mit 1 bis 1,5 cm Durchmesser am Ende des 9. Tages seine größte Ausdehnung erreicht.

Am 10. d.p.c. beginnt die Plazentation, indem sich embryonale und mütterliche Plazentateile entgegenwachsen. Das Kaninchen verfügt über eine chorio-allantoide Plazenta, die wie beim Menschen discoidal mit der mütterlichen Decidua in Verbindung steht. Dabei tauchen die Chorionzotten direkt in den mütterlichen, intervillösen Blutraum ein. Die fetale Kapillarwand stellt somit zusammen mit dem Zottenepithel die einzige Trennung zwischen beiden Kreisläufen dar.

Am gleichen Tag bilden sich die vorderen und hinteren Extremitätsknospen aus, und die Ohrbläschen schließen sich. Der Dottersack wird langsam durch das Exocoel verdrängt.

Am 11. Tag der Gestation ist die Gliederung der vorderen Extremitäten deutlich sichtbar. Außerdem setzt die Rippen, Kiefer und Gaumenbildung ein. Zu dieser Zeit können entsprechende Fehlbildungen an diesen Organen experimentell erzeugt werden. Andererseits kann man nach Art eines mißgebildeten Organes in etwa auf den Schädigungszeitraum Rückschlüsse ziehen.

Am 12. d.p.c. sind die fetalen Plazentagefäße voll entwickelt. Der Arttypus ist morphologisch festgelegt.

Die Fetogenese nimmt beim Kaninchen knapp 2/3 der gesamten Entwicklung ein. Die Schwangerschaft ist in der Regel nach 30 bis 32 Tagen beendet.

5. AUFBAU UND FUNKTION DER DOTTERSACKWAND

Die Dottersackwand besteht aus einem visceralen und einem parietalen Blatt, welche durch eine dünne Zelllage (= Reichert'sche Membran) getrennt sind. Nach den heutigen Erkenntnissen muß der visceralen Dottersackmembran (= vDS) eine besondere Bedeutung zugemessen werden.

Schon 1966 konnten *Johnson und Spinuzzi* Malat- und Lactat-Dehydrogenase-Aktivitäten an 11 - 13 Tage alten vDS bei der Ratte nachweisen.

Borstelmann et al. (1970) untersuchten ebenfalls Ratten DS-Membranen, die jedoch zwischen 12 und 20 Tage alt waren. Ihre elektronenmikroskopisch gewonnenen Ergebnisse ließen Speicher- und Verdauungsfunktionen gerade der vDS erkennen.

Sonoda et al. (1973) konnten auf Grund elektronenmikroskopischer Untersuchungen eine Mikropinozytose-Aktivität an DS-Membranen von Kaninchenembryonen nachweisen.

Williams et al. (1973) beobachteten, daß nach Gabe des Azo-farbstoffes, Trypan-Blue, die Aufnahme von Makromolekülen in das Dottersacklumen verhindert werden kann. Die Autoren benutzten als makromolekularen Stoff das Polyvinylpyrrolidon (= PVP) mit einem Molekulargewicht von etwa 11500. PVP wird unter anderem häufig als Lösungsmittel in pharmazeutischen Zubereitungen verwandt.

Die gleiche Arbeitsgruppe (*Lloyd et al.*, 1974) wies außerdem nach, daß Fehlbildungen durch Substanzen verursacht werden können (zum Beispiel Trypan-Blue), die selber den Embryo gar nicht erreichen. In elektronenmikroskopischen Untersuchungen zeigte sich, daß Trypan-Blue in die endodermalen Zellen des vDS eingelagert wird und dadurch entscheidende Transportvorgänge im Stoffwechselgeschehen blockiert (zum Beispiel Pinozytose und Proteinaufnahme).

Die Möglichkeit, daß auch andere Teratogene ähnliche Wirkmechanismen wie Trypan-Blue besitzen, konnte von verschiedenen Autoren gezeigt werden.

Kernis (1971) fand, daß Chlorambucil die Nahrungsübertragung auf den Embryo stört und Mißbildungen verursacht.

Brent et al. (1971) beobachteten embryonale Fehlbildungen und Resorptionen nach Applikation spezifischer Antikörper gegen DS-Membranen.

Entsprechende strukturelle Veränderungen konnten dann auch von *Jensen und Brent* (1974) und von *Franke et al.* (1975) nachgewiesen werden.

Nach weiteren Versuchen mit spezifischen Antikörpern gegen die Reichert'sche Membran (= RM), bzw. gegen die vDS kamen *Jensen et al.* (1975) zu der Vermutung, daß die vDS eher embryotrophische Funktionen, die parietale DS-Membran (= pDS) eher Aufgaben für das Wachstum und das Überleben des Keimes übernimmt. Diese Hypothesen müssen jedoch nach Meinung der Autoren erst durch weitere Stoffwechseluntersuchungen an den DS-Membranen gesichert werden.

Nicht nur chemische Noxen, sondern zum Beispiel auch Röntgenstrahlen, die teratogen wirken können, hemmen elektronenmikroskopisch sichtbare Phagozytoseaktivitäten in der vDS (*Franke und Goetze*, 1972).

6. ZUSAMMENSETZUNG DES KEIMANLAGENMATERIALS

Über die Zusammensetzung des Keimanlagenmaterials während der Embryonalzeit ist nur wenig bekannt. Das liegt einerseits daran, daß die Probengewinnung am lebenden Versuchstier erhebliche Probleme mit sich bringt, andererseits war es erst in den letzten Jahren durch die Einführung moderner Geräte möglich geworden, auch sehr geringe Mengen Untersuchungsmaterial laborchemisch zu analysieren. Außerdem ändern sich die physiologischen und biochemischen Verhältnisse während dieser Entwicklungsphase so schnell, daß es schwierig ist, verallgemeinernde Angaben zu machen. Verschiedene Labormethoden stellen einen weiteren Faktor dar, der bei der Interpretation der in der Literatur gemachten Angaben berücksichtigt werden muß.

6.1 pH

Die ersten pH-Messungen in der Blastozystenflüssigkeit des Kaninchens wurden von *Lutwak-Mann (1954)* und *Lutwak-Mann und Laser (1954)* durchgeführt. Die Autoren fanden am 8. d.p.c. einen mit Glaselektroden gemessenen pH-Wert zwischen 7,6 und 7,8. Außerdem stellten sie fest, daß das Keimanlagenmaterial vom 6. bis zum 8. d.p.c. einem konstanten Bikarbonatverlust ausgesetzt war. Die embryonale Bikarbonatkonzentration hatte am 8. d.p.c. die im mütterlichen Blut gemessenen Werte erreicht.

Hammer und Williams (1965) untersuchten den Säuregehalt des Eileiters von weißen Neuseeländerinnen. Es ergaben sich pH-Werte zwischen 7,8 und 8,2.

Schwick (1965) legte sehr umfangreiche Untersuchungen über die physiologischen Beziehungen zwischen Uterus und Blastozyste des Kaninchens vor. Der Autor fand vom 6. bis zum 7. d.p.c. in der Blastozyste pH-Werte zwischen 7,8 und 8,4, am 8. d.p.c. dagegen niedrigere Werte, die zwischen 7,3 und 7,85 lagen. Die Messungen wurden mit Indikatoren und Glaselektroden durchgeführt.

Petzold (1971) fand bei seinen Untersuchungen über das anorganische Milieu in der Kaninchenblastozyste zwischen dem 6. und 7. d.p.c. pH-Werte von 7,5 bis 7,7. Die Messungen erfolgten ebenfalls mit Hilfe von Glaselektroden, nachdem die Tiere getötet worden waren. Der Autor zeigte, daß die Tötung der Tiere zu pH-Verschiebungen im Sinne einer Alkalisierung führte.

Sehr ausführliche Untersuchungen über die embryonale Entwicklung des Kaninchens stammen von *Gottschewski und Zimmermann (1973)*. Während der Nidation (etwa 6. bis 7. d.p.c.) werden pH-Werte zwischen 7,6 und 8,2 angegeben. Im Uterus fand sich ein durchschnittlicher pH-Wert von 7,5.

6.2 Elektrolyte

Lewis und Lutwak-Mann (1954) fanden bei 8,5 Tage alten Keimanlagen eine Natrium-Konzentration von 144 mval/l und eine Kalium-Konzentration von 4,5 mval/l. Die beiden Ionen verändern ihre Konzentration bis zum 10. d.p.c.; für diese Zeit gaben die Autoren für Natrium 139 mval/l und für Kalium 6,3 mval/l an. Die Calcium-Konzentration betrug am 10. d.p.c. 11,2 mg/100 ml (*Lutwak-Mann, 1954*).

Die gleiche Autorin (*Lutwak-Mann, 1959*) beobachtete, daß der Natrium-Gehalt zwischen dem 6. d.p.c. und dem 8. d.p.c. anstieg, während die Kalium-Konzentration in dieser Zeit leicht abfiel. Am 8. d.p.c. wurden für Natrium 128 - 145 mval/l und für Kalium 4,5 - 6,5 mval/l gemessen.

Lutwak-Mann et al. (1960) zeigten, nachdem sie radioaktiv markierte Ionen parenteral injiziert hatten, daß zwischen dem 7. und 10. d.p.c. vermehrt Elektrolyte in die Keimanlage aufgenommen wurden. Am 6. d.p.c. war die Ionenaufnahme am geringsten.

Hammer und Williams (1965) untersuchten die Eileiterflüssigkeit bei weißen Neuseeländerinnen. Sie gaben Natrium-Werte von 128 mval/l und Kalium-Werte von 5,6 mval/l an.

Smith (1970) erhielt bei seinen Untersuchungen über den Ionentransport bei 6 Tage alten Blastozysten Natrium-Konzentrationen von durchschnittlich 144 mval/l. Die Kalium-Werte lagen um 9,2 mval/l.

Bei *Petzold (1971)* ergaben die Natrium-Bestimmungen am 6. d.p.c. 122 mval/l, am 6,5. d.p.c. 129 mval/l und am 7. d.p.c. 147 mval/l. Bei der Untersuchung der Kalium-Konzentrationen erhielt der Autor folgende Ergebnisse: 6. d.p.c. - 9,4 mval/l, 6,5. d.p.c. - 9,2 mval/l und 7. d.p.c. - 10,9 mval/l. Die im Vergleich zu anderen Ergebnissen hohen Kalium-Werte waren darauf zurückzuführen, daß die Untersuchungen nach Tötung der Tiere erfolgte, wodurch

die Kalium-Konzentrationen um etwa den doppelten Betrag anstiegen.

Cross (1973) zeigte, daß der Natrium-Transport in die Kaninchenkeimanlage (6. d.p.c.) einen aktiven Mechanismus darstellt.

Gottschewski und Zimmermann (1973) beobachteten, daß die Keimanlagen bis zum 8. d.p.c. laufend Ionen aufnehmen. Am 10. d.p.c. betrug nach Angaben der Autoren die Natrium-Konzentration in der DS-Flüssigkeit 131 mval/l, die Kalium-Konzentration 6,8 mval/l. Im Gegensatz hierzu wurden im Muttertier unterschiedliche Werte gemessen: Natrium - 140 mval/l und Kalium - 5,5 mval/l.

Shami et al. (1975) konnten auch für Calcium einen aktiven Transportmechanismus zwischen Mutter und Embryo nachweisen.

6.3 Eiweiß

Holmdahl und Mastroianni (1965) untersuchten die Zusammensetzung des Eileitersekretes bei Kaninchen. Dabei fanden sie kurz nach der Ovulation eine Gesamteiweißkonzentration von 2,7 g/100 ml.

Hafez und Sugawara (1968) erhielten bei ihren umfangreichen Untersuchungen an 9 Tage alten Kaninchenembryonen eine Dottersackeiweißkonzentration von durchschnittlich 2,7 g/100 ml.

Kirchner (1969) konnte zeigen, daß ein großer Teil der Sekretproteine im Uterus schwangerer Kaninchen zur Gruppe der Glukoproteine gehörte, die nach Meinung des Autors vermutlich eine Bedeutung für die Ernährung oder die Morphogenese des Embryos haben. Er fand vier uteruspezifische Proteine, die im mütterlichen Blut nicht nachgewiesen werden konnten. Der Autor diskutierte eine de-novo-Synthese im Endometrium des Uterus.

6.4 Glukose und Lactat

Intwak-Mann (1959) fand bei 8 Tage alten Kaninchenembryonen in der Blastozystenflüssigkeit eine Glukosekonzentration von 62 mg/100 ml. Im mütterlichen Blut wurden von der Autorin 85 mg/100 ml gemessen.

Fridhandler (1959) konnte zeigen, daß der Glukose eine entscheidende Stellung im Aminosäuremetabolismus zukommt. Die Kultivierung von 5 und 6 Tage alten Kaninchenblastozysten in Ringer-bicarbonat-Lösung führte zum totalen Verlust von Glycin und zum Zusammenbruch der inneren Zellagen. Ein Glukosezusatz verhinderte diesen Vorgang und Glycin verblieb im Inneren der Blastozyste.

Am 9. d.p.c. wurden von *Lutwak-Mann (1962)* im Dottersack von Kaninchenembryonen für Glukose 80 mg/100 ml und für Lactat 75 mg/100 ml gemessen. Die mütterlichen Werte lagen bei der Glukose um 100 mg/100 ml und beim Lactat um 10 mg/100 ml.

Daniel (1965) konnte bei der Kultivierung von 5 Tage alten Kaninchenblastozysten nachweisen, daß die Nährflüssigkeit neben anderen Substanzen auch Glukose enthalten mußte, um ein zufriedenstellendes Wachstum zu garantieren. Dem Autor fiel weiterhin auf, daß eine hohe Lactatkonzentration das Wachstum stimulierte.

Hafez und Sugawara (1968) fanden im Dottersack am 9. d.p.c. einen Glukosegehalt zwischen 62 und 121 mg/100 ml. Die Lactatkonzentration wurde zwischen 63 und 72 mg/100 ml angegeben. Die Versuche wurden an Kaninchenembryonen durchgeführt. Die Autoren beobachteten, daß die Konzentration verschiedener Nährstoffe nicht nur von Species zu Species, sondern auch innerhalb einer Species von Weibchen zu Weibchen stark variieren konnte.

6.5 Aktivität der alkalischen Phosphatasen

Neben der allgemein bekannten Erhöhung der alkalischen Phosphatasen-Aktivität bei verstärkter Osteoblastentätigkeit (zum Beispiel während des Knochenwachstums in der Kindheit) und einer physiologischen Erhöhung während der Schwangerschaft (*Hebold und Czerwek, 1972*) sind in der Literatur keine Angaben bekannt, die die Aktivität der alkalischen Phosphatasen in der Umgebung des Embryos beschreiben. Es ist jedoch denkbar, daß die alkalischen Phosphatasen auf Grund ihrer Funktion bei der Spaltung bestimmter Phosphatester vor dem Transport durch eine Zellmembran (*Bielka, 1973*), auch bestimmte Aufgaben in der embryonalen DS-Membran übernehmen.

6.6 Freie Aminosäuren

Pincus (1941) entdeckte bei der Kultivierung von 3 Tage alten Kaninchenblastozysten, daß neben anderen Stoffen auch Aminosäuren für das embryonale Wachstum von Bedeutung sind. Er konnte mit Hilfe von Cystein das Blastozystenwachstum stimulieren und schrieb vor allen Dingen den Sulfhydrylverbindungen eine entscheidende Aufgabe während dieser frühen Entwicklungsphase zu.

Gregoire et al. (1961) bestimmten freie Aminosäuren im Genitaltrakt von weiblichen Kaninchen. Sie fanden dabei im Uterus besonders hohe Konzentrationen an Glutaminsäure (11,9 mg/100 ml), Glycin (26,8 mg/100 ml) und Serin (10,4 mg/100 ml). Threonin war zwar im Uterus vorhanden, konnte jedoch in den Tuben nicht nachgewiesen werden.

Die freien Aminosäuren Arginin, Cystein, Histidin, Leucin und Threonin hatten in den Versuchen von *Gwatkin (1966)* für das Wachstum von Mäuse-Blastozysten einen essentiellen Charakter. Lysin, Phenylalanin, Methionin, Tryptophan und Tyrosin hemmten das Wachstum.

Daniel und Krishnan (1967) fanden bei Kultivierungsversuchen von 5 Tage alten Kaninchenembryonen folgende, für das Wachstum essentielle Aminosäuren: Arginin, Lysin, Tryptophan, Methionin, Phenylalanin, Leucin, Valin, Threonin und Serin. Außerdem beobachteten die Autoren Interaktionen zwischen Serin und Glycin, wobei während eines erhöhten Glycinangebotes der Seringehalt sank. Der Verbrauch von Arginin und Lysin war in der Blastozystenflüssigkeit besonders hoch, was nach Ansicht der Autoren auf die Synthese von spezifischen Proteinen zurückgeführt werden könnte. Auch das Fehlen aller nicht essentiellen Aminosäuren verursachte eine Wachstumsstörung.

Die Untersuchungen von *Kirchner (1969)* ergaben, daß der Kaninchenembryo seinen Energiebedarf besonders aus den freien Aminosäuren, Proteinen und Glukoproteinen deckt. Glycin konnte zum Beispiel schon vom 2-Zellstadium an metabolisiert werden.

Brinster (1971) zeigte bei der Maus, daß Aminosäuren sowohl durch aktive Transportmechanismen, als auch durch freie Diffusion, in die Blastozyste gelangen konnten. Vom 1-Zell- bis zum Morulastadium stieg die Aminosäureaufnahme um das 5-fache.

7. FRAGESTELLUNG UND VERSUCHSPLANUNG

In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, ob eine nachweisbar embryotoxische Dosis von CP in der Lage ist, die Zusammensetzung der Dottersackflüssigkeit beim Kaninchen am 9. Tag der Gestation zu verändern.

Dazu mußten im Einzelnen folgende Fragen geklärt werden:

- a) Bei welcher CP-Dosis zeigt sich gegenüber einer Kontrolle eine eindeutige embryotoxische oder teratogene Wirkung?
- b) Wie kann die, für die Probenentnahme in vivo notwendige Narkose durchgeführt werden, damit methodisch bedingte Einflüsse in ihrer Auswirkung überschaubar und möglichst gering gehalten werden können?
- c) In welcher Zeit nach Applikation von CP treten Veränderungen auf, wie groß ist der Unterschied zu einer Kontrolle, und sind diese Veränderungen nur in der Dottersackflüssigkeit, oder auch im mütterlichen Blut nachweisbar?

Zur Beantwortung dieser Fragen wurden drei Versuchsserien geplant:

In VERSUCHSSERIE I sollten zunächst drei verschiedene Dosen CP auf ihre embryotoxische Wirkung geprüft werden. Um methodisch bedingte Einflüsse zu erkennen, wurde eine unter gleichen Bedingungen durchgeführte Kontrolle geplant. Die in der Literatur angegebenen, für den Kaninchenembryo teratogen wirkende Dosis von 40 mg/kg KG, sollte auch in diesen Versuchen zur Anwendung kommen. Außerdem war geplant, die Hälfte (= 20 mg/kg KG) und das Doppelte dieser Dosis (= 80 mg/kg KG) zu testen, da die Literaturangaben teils widersprüchlich waren.

In VERSUCHSSERIE II sollten die Einflüsse der Narkose und der Beatmung, wie sie auch schon bei der direkten Applikation von Substanzen in den Dottersack - sogenannte Dottersackmethode - von (Claussen und Breuer, 1976) angewandt wurde, auf das Stoffwechselverhalten des Muttertieres geprüft werden. Zur Beurteilung methodisch bedingter Veränderungen waren pH-Messungen und Blutgasanalysen geplant. In Versuchsserie III (siehe unten) sollte die Technik zur Anwendung kommen, die am Muttertier möglichst geringe Abweichungen dieser Parameter hervorruft.

In VERSUCHSSERIE III sollte die Dottersackflüssigkeit und das mütterliche Blut untersucht werden. Um einen Überblick über die Bestimmbarkeit und Größenordnung der einzelnen Parameter zu bekommen, war zunächst die Bestimmung von Normalwerten bei unbehandelten Tieren geplant.

Die Untersuchungen mit CP sollten 1, 3, 6 und 12 Stunden nach Applikation durchgeführt und mit den ebenfalls zu diesen Zeitpunkten bestimmten Kontrollwerten verglichen werden, weil nach Literaturangaben über den Metabolismus von CP beim Kaninchen (*Dold und Gaertner, 1972; Krengel, Diss.in Vorbereitung*) in diesem Zeitraum (bis 12 Stunden nach Applikation) mit Wirkungen gerechnet wurde.

Die Auswahl der Parameter, die auf Veränderungen hin geprüft werden sollten, wurden unter folgenden Gesichtspunkten ausgewählt:

- a) Zur Klärung der Fragestellung mußte ein möglichst breit gefächertes "screening-Programm" erstellt werden, um keine entscheidenden Einflüsse auf bestimmte, in der Dottersackflüssigkeit vorhandene Stoffgruppen zu übersehen.
- b) Die zu untersuchenden Parameter sollten eine wichtige Rolle im embryonalen Stoffwechselgeschehen spielen und in irgend einer Weise an bestimmten Transportvorgängen beteiligt sein.
- c) Die Labormethoden sollten sich bereits in der täglichen Praxis bewährt haben und sicher durchzuführen sein, damit die Ergebnisse, gerade auch wegen des Vergleiches mit einer Kontrolle, möglichst reproduzierbar sind.

Folgende Parameter wurden sowohl im mütterlichen Blut, als auch in der Dottersackflüssigkeit bestimmt:

- a) pH, pCO₂ und pO₂ - zur Beurteilung der Gesamtstoffwechsellage und des mütterlich-embryonalen Gasaustausches;
- b) Natrium, Kalium und Calcium - wegen deren Bedeutung im anorganischen Milieu und ihrer Stellung bei der Aufrechterhaltung des osmotischen Gleichgewichtes;
- c) Gesamteiweiß - zur Beurteilung der Durchlässigkeit der DS-Membran für makromolekularer Substanzen;

- d) Glukose und Lactat - wegen der Bedeutung dieser Substanzen bei der metabolischen Energiegewinnung;
- e) alkalische Phosphatasen - wegen deren entscheidende Stellung bei Knochenbildung und Transportvorgängen;
- f) freie Aminosäuren - wegen der Bedeutung als embryonale Energie- und Ernährungsquelle und der Funktion als Protein- und Nucleinsäurebausteine;

8. MATERIAL UND METHODE

8.1 Tierstamm, Tierhaltung und Behandlungstermin

Als Versuchstiere dienten reinrassige Kaninchen (weiße Neuseeländerinnen). Die Tiere wurden in Einzelkäfigen gehalten und mit standardisiertem Trockenfutter und Wasser ad libitum ernährt. Die Experimente mit tragenden Häsinnen erfolgten am 9. Tag der Gestation (= 9. d.p.c.). Die Weibchen wurden hierzu mit ebenfalls reinrassigen Rammlern doppelt belegt. Der Tag der Paarung galt als 0. d.p.c.. Das Gewicht der tragenden Tiere lag zwischen 3,0 und 4,8 kg.

In den Versuchen mit nicht tragenden Tieren (siehe Versuchsserie II) kamen solche Kaninchen zur Anwendung, deren Gewicht ebenfalls zwischen 3,0 und 4,8 kg lag.

Es wurden drei Versuchsserien mit insgesamt 120 Muttertieren durchgeführt.

8.2 VERSUCHSSERIE I - Teratologische Untersuchungen nach intravenöser Applikation von Cyclophosphamid (CP)

Drei Versuchsgruppen, die sich durch die Behandlungsdosis unterschieden, wurden einer Kontrollgruppe gegenübergestellt. Folgende Dosen kamen zur Anwendung:

- a) Versuch I/1 - 20 mg CP/kg Körpergewicht
- b) Versuch I/2 - 40 mg CP/kg Körpergewicht
- c) Versuch I/3 - 80 mg CP/kg Körpergewicht

CP, gelöst in physiologischer Kochsalzlösung, wurde den trächtigen Tieren in die Ohrvene injiziert. Im Kontrollversuch erhielten die Häsinnen lediglich das Lösungsmittel, und zwar 4 ml physiologische NaCl/kg KG. Dies entsprach der Lösungsmittelmenge der 80 mg-Dosis (80 mg CP sind in der pharmazeutischen Zubereitung in 4 ml physiologischer NaCl gelöst). CP wurde als Endoxan⁰ - Asta von der Apotheke bezogen.

Nach der Behandlung (9. d.p.c.) wurden die Tiere am 28. Tag der Gestation getötet, laparotomiert und die Uteri entnommen. Nach Bestimmung der Anzahl toter und lebender Feten entfernte man die Eihäute und trennte die Jungtiere an der Nabelschnur ab.

Die Anzahl resorbierter Feten, einschließlich mazerierter Feten, wurde protokolliert.

Frühe Stadien der Resorption fallen dadurch auf, daß das Uterusrelief an dieser Stelle leicht zerklüftet erscheint. Der etwa 1 cm^2 große Bereich hebt sich deutlich durch seine gelbliche Verfärbung gegenüber der sonst rötlichen Uterusschleimhaut ab. Spätere Stadien imponieren durch ihre papulöse Form und feste Konsistenz. Im Fetalstadium abgestorbene Keime waren am 28. d.p.c. verschieden stark mazeriert.

Bei der makroskopischen Untersuchung der Feten achtete man besonders auf Oesophagus- und Analatresien, Organdysgenesien, Augenmißbildungen, Spaltbildungen des Gaumens und der Wirbelsäule, sowie auf Extremitätendysplasien.

Anschließend wurde das Gewicht und die Scheitelsteißlänge bestimmt und die Feten für eine röntgenologische Skelettuntersuchung aufgearbeitet:

a) Abtrennung der Extremitäten

Nach Präparation der gesamten Haut wurden die oberen Extremitäten vorsichtig abgezogen, so daß Scapula und Clavicula am jeweiligen Oberarm verblieben.

Die unteren Extremitäten behandelte man nach Durchtrennung der Symphyse entsprechend.

b) Aufarbeitung des Schädels

Den Kopf trennte man am Atlanto-occipital-Gelenk von der Wirbelsäule ab. Der Unterkiefer wurde anschließend vorsichtig, unter Schonung des Angulus, entfernt, die Kalotte vom Rest des Schädels kreisförmig abgeschnitten und das Gehirn entnommen.

c) Aufarbeitung des Brustkorbes

Die Rippen wurden beiderseits in der mittleren Axillarlinie durchtrennt. Hierdurch konnte das Sternum mit dem ventralen Anteil der Rippen vom dorsalen Teil des Thorax isoliert werden.

d) Röntgenuntersuchung

Die Teile des Skelettsystems eines einzelnen Feten wurden mit den verbliebenen Muskeln auf einen Film gelegt und geröntgt.

Film: Structurix D 4 P, 10 x 23,5 cm (Agfa Gefaert)

Röntgengerät: Mommograph

Belichtung: 10 sec., 20 KV, 35 mAs;

Bei der makroskopischen und röntgenologischen Untersuchung der Feten konnten mikroskopisch erkennbare Fehlbildungen nicht erfaßt werden.

In dieser Versuchsserie wurden insgesamt 48 Muttertiere mit CP, oder physiologischer NaCl-Lösung behandelt und 250 Feten in der oben beschriebenen Weise untersucht.

8.3 VERSUCHSSERIE II - Standardisierung der Narkose und Beatmungstechnik

In Versuchsserie II wurde die Narkose und Beatmungstechnik im Hinblick auf operationsbedingte Veränderungen des pH und der Blutgase, $p\text{CO}_2$ und $p\text{O}_2$, standardisiert.

Zur Gewinnung von Dottersackmaterial am lebenden Versuchstier ist eine Operation unter Narkose unumgänglich. Jedoch darf sich die Dottersackflüssigkeit und damit auch das mütterliche Blut durch diesen Eingriff nicht wesentlich verändern. Außerdem muß die Methode standardisiert sein, damit sowohl die Kontrolltiere, als auch die Versuchstiere, den gleichen Bedingungen unterworfen werden.

Es kamen in dieser Versuchsserie neben tragenden auch nicht tragende Häsinnen zur Anwendung. Die Auswahl richtete sich nach dem Körpergewicht, wobei die nicht tragenden Tiere den schwangeren Tieren bezüglich des Gewichtes entsprachen (3,0 - 4,8 kg).

Vier Versuchsgruppen standen einer Kontrollgruppe gegenüber:

a) Versuch II/1 - Über eine Maske wurde die Narkose durch "schnelles Anfluten" eingeleitet. Das Gasgemisch enthielt etwa 25 Vol% Äther und 75 Vol% reinen Sauerstoff. Über dem Atemvolumen hinaus angebotenes Gas konnte über ein Ventil automatisch entweichen. Nach 4 - 6 Minuten waren die Tiere reflexlos (Cornealreflex). Insgesamt 10 Minuten nach Narkosebeginn reduzierte man die Ätherkonzentration auf 8 - 10 Vol%. Die Beatmung erfolgte auch weiterhin über die Maske. Als Narkosegerät diente der Ätherverdunster "Vapor" der Firma Dräger.

b) Versuch II/2 - Im Gegensatz zum Versuch II/1 wurde die Narkose einschleichend begonnen. Die Ätherkonzentration betrug zu Beginn 2 Vol%. Sie wurde um 2 Vol% /min. gesteigert. Bis zur Reflexlosigkeit der Tiere vergingen etwa 10 Minuten, in denen sie, im Gegensatz zum ersten Versuch, erhebliche Abwehrreaktionen gegen die Narkose zeigten. Als Narkotikum diente in diesem Versuch ein Äther-Preßluftgemisch.

c) Versuch II/3 - Die Beatmung erfolgte mit einem Äther-Preßluftgemisch (siehe Versuch II/2), welches jedoch wie im Versuch II/1 mit maximaler Ätherkonzentration angeflutet wurde. Nachdem die Tiere keine Reflexe mehr zeigten (etwa nach 4 - 6 Minuten), intubierte man sie mit einem Säuglings-Trachealtubus und reduzierte die Ätherkonzentration auf 8 - 10 Vol%.

d) Versuch II/4 - Die Methode war die gleiche wie im Versuch II/3 (schnelles Anfluten, Äther-Preßluft, Intubation); es kamen jedoch tragende Tiere zur Anwendung. Diese befanden sich am 9. d.p.c.. Außerdem gab man Sauerstoff in geringen Konzentrationen hinzu, was über ein Flowmeter kontrolliert werden konnte. Die Sauerstoffgesamtkonzentration (O_2 aus der zugeführten Luft + O_2 in reiner Form) betrug immer zwischen 30 und 40 Vol%.

e) Kontrollversuch II/K - Weibliche Tiere mit einem Körpergewicht zwischen 3,0 und 4,8 kg wurden im nicht-narkotisierten Zustand untersucht.

Neben dem pH bestimmte man in allen Versuchen den $p\text{CO}_2$ und $p\text{O}_2$. Die Untersuchungen erfolgten im arteiellen Blut, welches der zentralgelegenen Ohrarterie entnommen wurde. Die Labormethode wird im Absatz 8.4.5.1 beschrieben.

An jedem Tier wurden zwei Blutentnahmen vorgenommen:

In den Versuchen II/1 - II/3 entnahm man zur Beurteilung der Narkoseeinführung etwa 10 Minuten nach Narkosebeginn die erste Probe. Bei den tragenden Tieren im Versuch II/4 erfolgte die erste Untersuchung vor der Narkose, um eventuelle Auswirkungen der Schwangerschaft auf den Säure-Basenhaushalt zu erfahren.

Die zweite Untersuchung fand bei allen Tieren 30 Minuten nach Narkosebeginn statt. Hierdurch sollten Auswirkungen von Kompensationsmechanismen in Abhängigkeit von Versuchsanordnung, bzw. Schwangerschaft geklärt werden.

Die Häsinnen im Kontrollversuch II/K wurden im nicht-narkotisierten Zustand untersucht. Es sollten damit Normalwerte bei nicht-tragenden weiblichen Tieren, die sich im geschlechtsreifen Alter befanden, zum Vergleich aufgestellt werden.

In den Versuchen II/1 - II/3, sowie im Kontrollversuch II/K, wurden jeweils 5 Tiere, im Versuch II/4 10 Tiere untersucht.

8.4 VERSUCHSSERIE III - Untersuchungen des mütterlichen Blutes und der Dottersackflüssigkeit nach i.v. Applikation von Cyclophosphamid

8.4.1 Übersicht

Versuchsserie III gliedert sich in zwei größere Komplexe:

- a) Bestimmung von Normalwerten am 9. Tag der Gestation
- b) Untersuchungen nach intravenöser Applikation von CP/NaCl zu vier verschiedenen Zeitpunkten (1, 3, 6 und 12 Stunden nach der Behandlung) am 9. Tag der Gestation

Die Versuche erhielten folgende Bezeichnungen:

Versuch III/N	= Kontrollwerte
Versuch III/CP ₁ , bzw. III/NaCl ₁	= Untersuchungen 1 Stunde nach Applikation von CP, bzw. physiologischer NaCl-Lösung
Versuch III/CP ₃ , bzw. III/NaCl ₃	= Untersuchungen 3 Stunden nach Applikation von CP, bzw. physiologischer NaCl-Lösung
Versuch III/CP ₆ , bzw. III/NaCl ₆	= Untersuchungen 6 Stunden nach Applikation von CP, bzw. physiologischer NaCl-Lösung
Versuch III/CP ₁₂ , bzw. III/NaCl ₁₂	= Untersuchungen 12 Stunden nach Applikation von CP, bzw. physiologischer NaCl-Lösung

Die Gewinnung der Dottersackflüssigkeit erfolgte am lebenden Tieren, die hierzu im narkotisierten Zustand operiert wurden. Die Untersuchung des mütterlichen Blutes wurde doppelt, und zwar vor und während der Operation, durchgeführt. Man konnte dadurch operationsbedingte Einflüsse auf den Stoffwechsel erkennen.

Eine Ausnahme bildete die Bestimmung der Aminosäurekonzentration. Hier konnte wegen einer begrenzten Verfügbarkeit des Analysators nur eine mütterliche Probe untersucht werden. Man entschloß sich, wegen des besseren Vergleiches zu den Dottersackwerten, auch die Aminosäuren im mütterlichen Blut während der Operation zu analysieren.

8.4.2 Probengewinnung

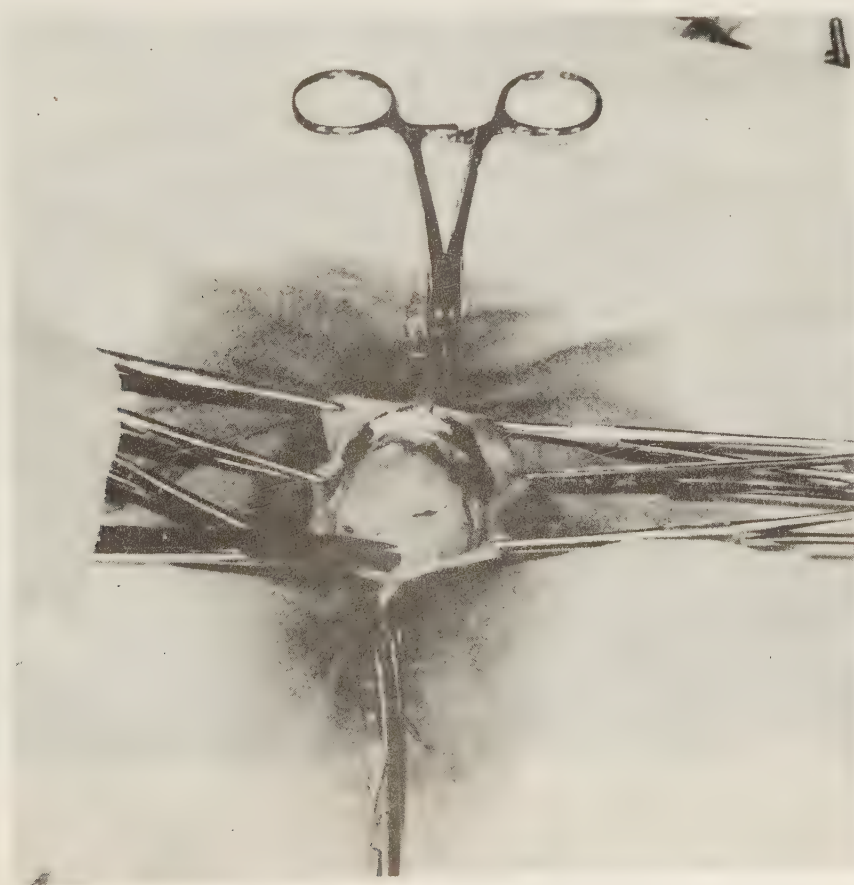
Für die einzelnen Versuche der Versuchsserie III wurden weibliche Kaninchen verwandt, die sich am 9. Tag der Gestation befanden. Die Schwangerschaft stellte man durch Tasten fest. Bei schwangeren Tieren kann man die Keimanlagen als kirschgroße Gebilde von prall-elastischer Konsistenz im Unterbauch tasten. Auf diese Weise ist nicht nur die Größe, sondern auch die Anzahl der Keimanlagen ungefähr bestimmbar.

Tiere mit einem positiven Tastbefund wurden in eine Haltebox gesetzt und wie im Versuch II/4 (siehe Absatz 8.3) narkotisiert. Nach Erreichen der notwendigen Narkosetiefe legte man die Kaninchen auf einen Operationstisch, befestigte in Rückenlage die Extremitäten, entfernte die Bauchhaare und wusch das Operationsgebiet mit Dibromol⁰ ab. Anschließend wurde der Bauchraum durch zwei mediane Schnitte (Haut, sowie Muskulatur zusammen mit Peritoneum) eröffnet. Um Blutverluste zu vermeiden, wurde der Musculus rectus abdominis in der Linea alba durchtrennt. Nach Reposition der Harnblase konnte der Uterus duplex von der Bifurkation bis zu den Ovarien gut übersehen und abgetastet werden.

Die Keimanlagen stellten sich als runde, zwischen 0,5 und 1,5 cm große Bläßchen dar. Siehe auch die Abbildungen 3 - 5, Seite 37 f.

Die für die Untersuchungen notwendige Dottersackflüssigkeit wurde anschließend durch Punktion gewonnen. Mit Hilfe eines tangentialen Einstiches vermied man, daß Flüssigkeit an der Punktionsstelle verloren ging (siehe Abb. 6 - 8).

Abbildung 3 - Blick auf die Bauchmuskulatur nach durchtrennter Bauchhaut



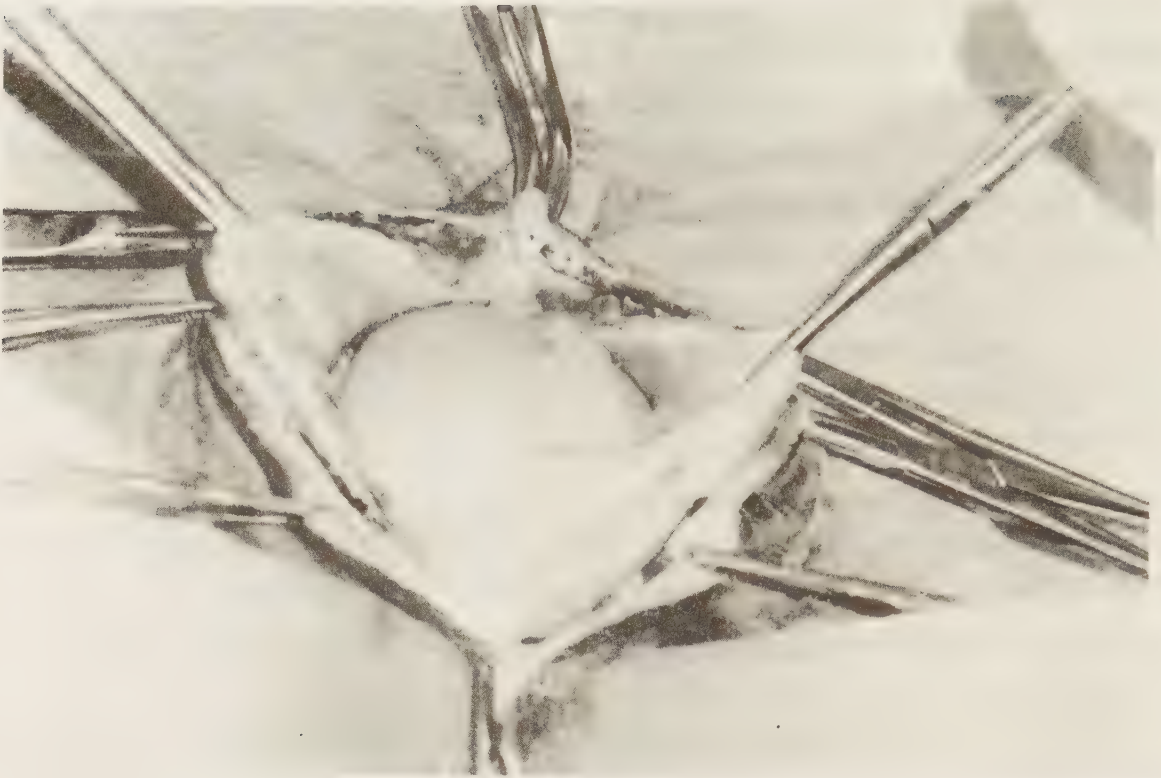
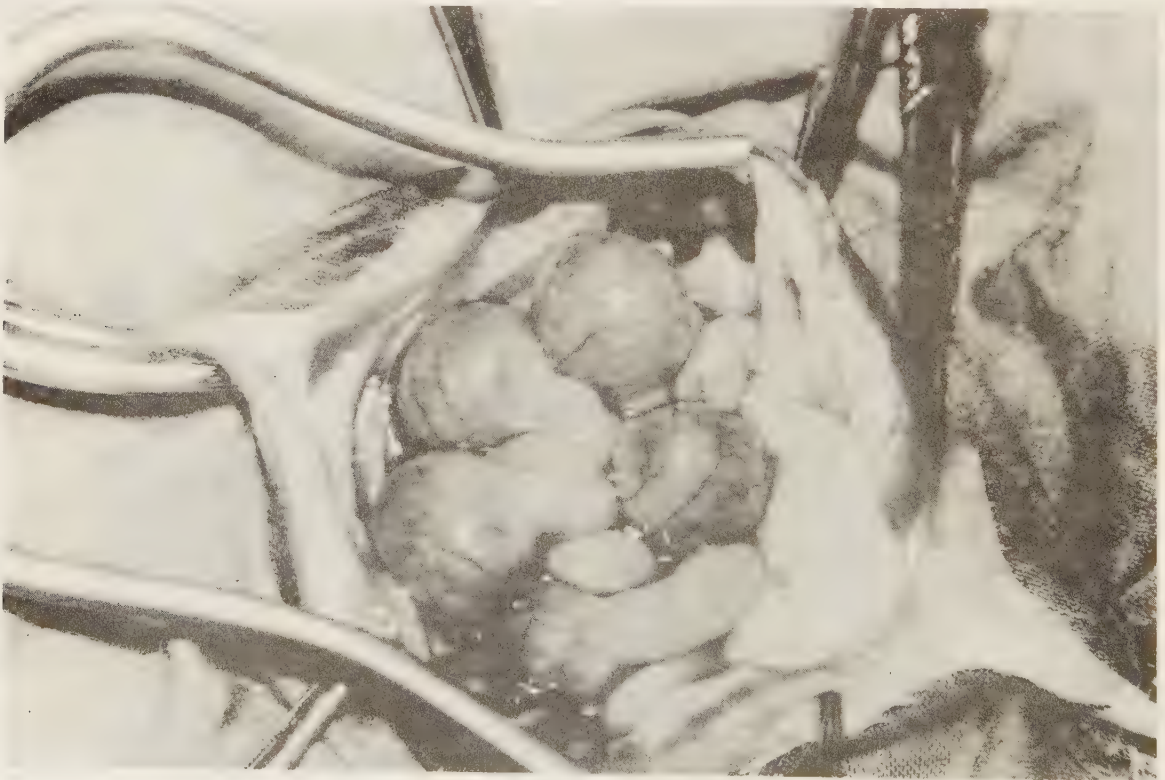


Abbildung 4 - Hervortretende Harnblase nach Eröffnung des Bauchraumes

Abbildung 5 - Blick auf den Uterus; nach Reposition der Harnblase erkennt man deutlich die rundlichen Keimanlagen



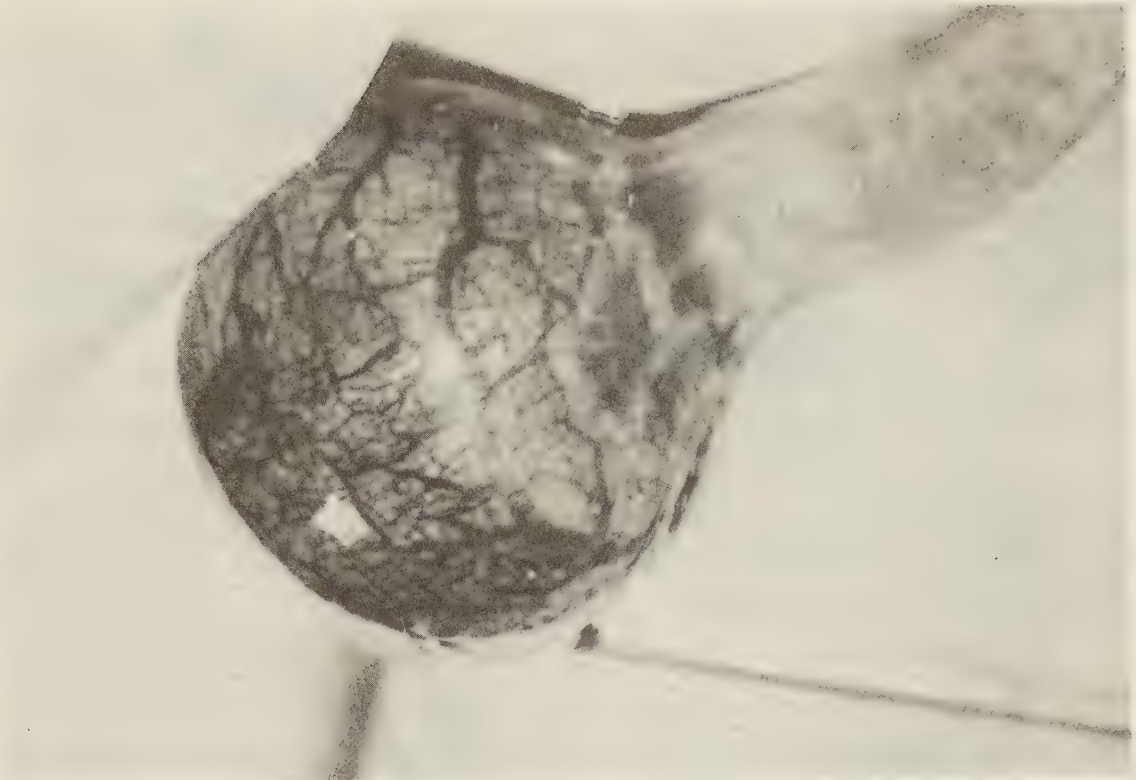
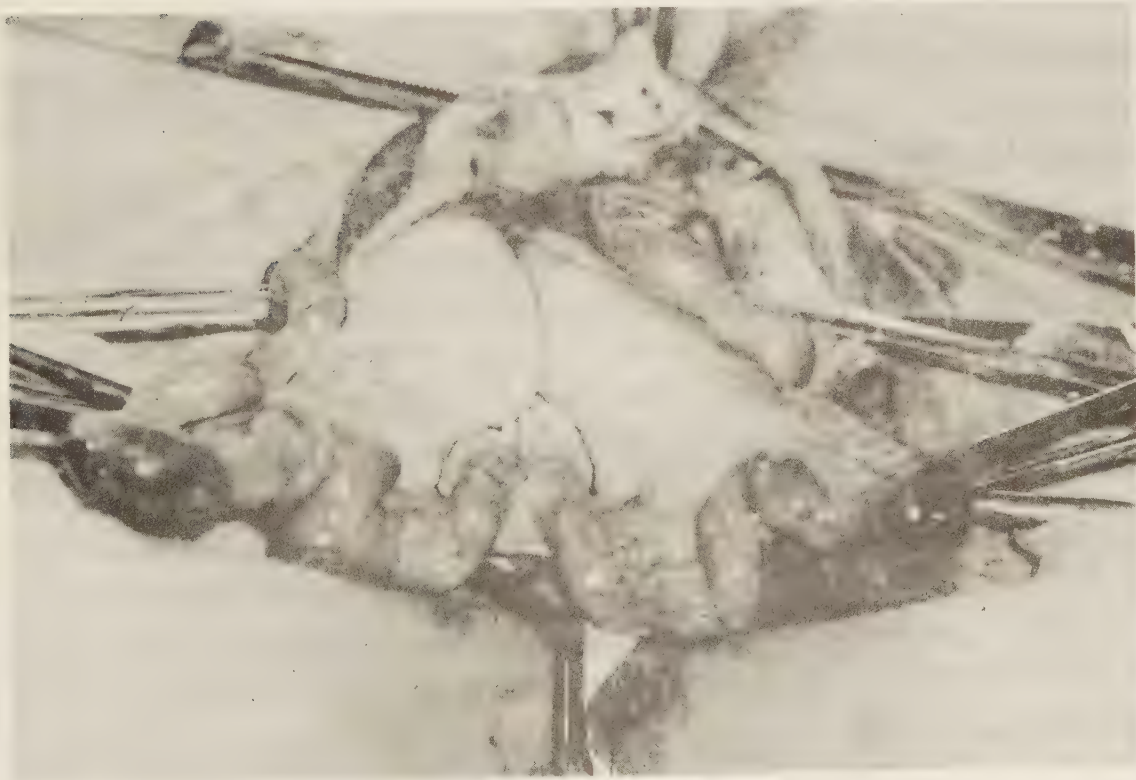


Abbildung 6 - Tangentialer Einstich in den distalen Pol der Keimanlage; die Spitze der Nadel liegt im Dottersack

Abbildung 7 - Blick auf den Uterus bicornis; die Teilungsstelle (Bifurkation) und die nach der Entnahme der Dottersackflüssigkeit zusammengefallenen Keimanlagen sind sichtbar



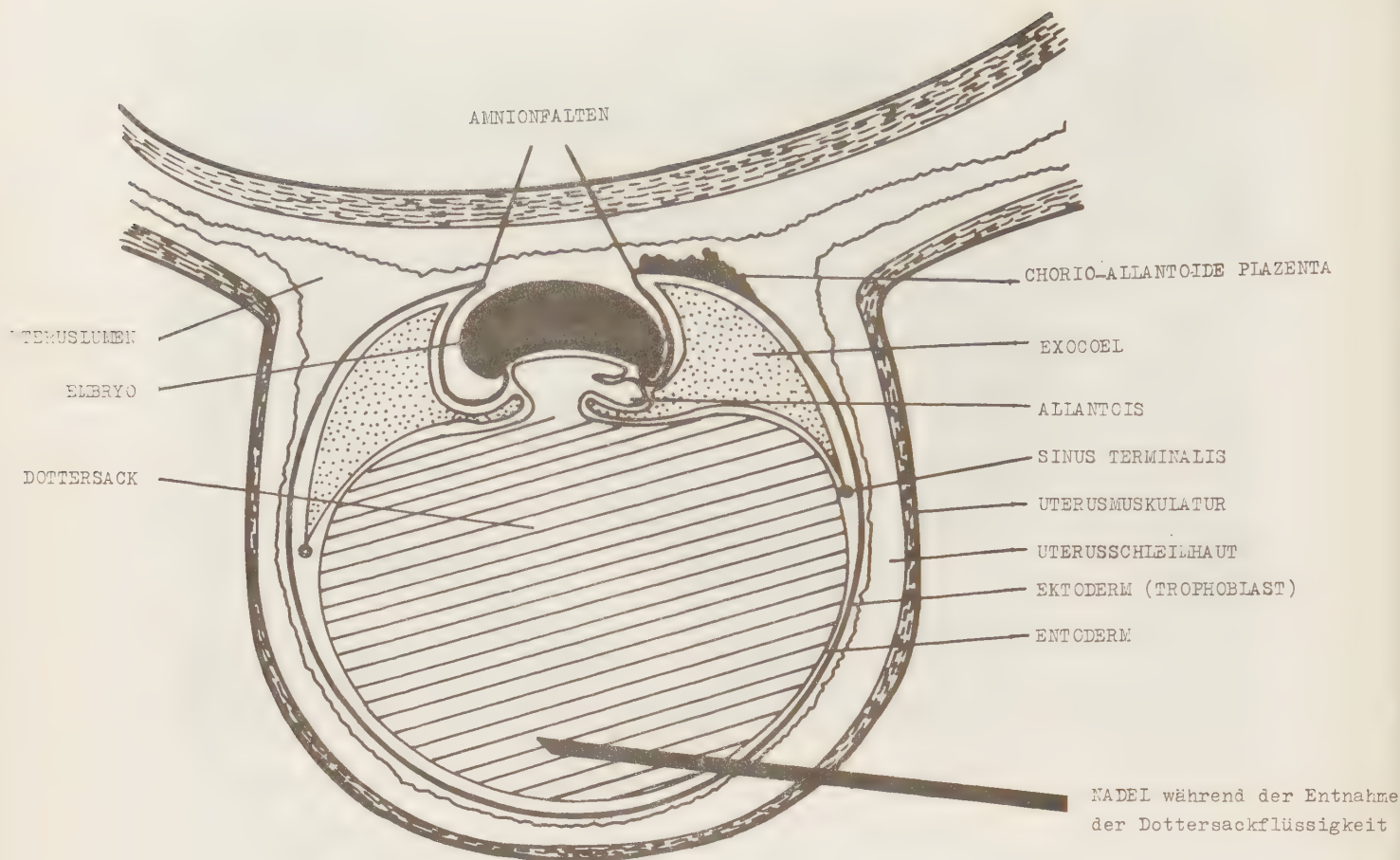


Abbildung 8 - Schematische Darstellung einer Kaninchenkeimanlage am 9. Tag der Schwangerschaft -vergleiche auch Abb. 6, Seite 39 (nach Seidel (1960), verändert)

Die Menge, die pro Keimanlage entnommen werden konnte, schwankte zwischen 0,4 und 1,3 ml. Es handelte sich um eine teils klare, teils leicht trübe, weißliche Flüssigkeit.

Da die Menge einer Keimanlage für alle Bestimmungen nicht ausreichte, wurde die gesamte Keimanlagenflüssigkeit eines Muttertieres zusammengebracht. Nur für die Bestimmung des pH und der Blutgase verwendete man die Dottersackflüssigkeit einer einzigen Keimanlage, da die entnommene Probe luftdicht verschlossen aufbewahrt werden mußte (siehe Absatz 8.4.5.1).

Nach Entnahme der Dottersackflüssigkeit und des mütterlichen Blutes wurden die Tiere, die zuvor mit CP behandelt worden waren, getötet. Bei den Kontrolltieren reponierte man den Uterus und verschloß das Peritoneum zusammen mit dem geraden Bauchmuskel in einer fortlaufenden Naht. Die Bauchhaut wurde mit Einzelnähten versorgt.

Diese Tiere saßen etwa 15 Minuten nach Operationsende wieder in ihrer gewohnten Hockstellung.

Die Operationsdauer lag zwischen 15 Minuten (Tiere, die nach der Probeentnahme getötet wurden) und 25 Minuten (Kontrolltiere).

8.4.3 Bestimmung von Normalwerten

In diesem Versuch wurden tragende Tiere am 9. d.p.c. untersucht. Dabei achtete man nicht auf den genauen Schwangerschaftszeitpunkt, sondern nahm alle Kaninchen in den Versuch, die sich zwischen dem 9. und 9,5. Tag der Gestation befanden.

Für die Untersuchungen entnahm man etwa 10 ml mütterliches Blut direkt vor Operationsbeginn (Wert 1).

Die zweite Probe wurde während der Operation entnommen (Wert 2).

Die Entnahme der Dottersackflüssigkeit (Wert 3) erfolgte zum gleichen Zeitpunkt wie die Blutentnahme beim Muttertier (Wert 2).

In allen Versuchen dieser Arbeit wurde arterielles Blut entnommen, da die Ohrvenen nach Punktion häufig kollabierten.

Die schon in Kapitel 7 aufgezählten Parameter (pH, $p\text{CO}_2$, $p\text{O}_2$, Na^+ , K^+ , Ca^{++} , Gesamteiweiß, Glukose, Lactat und alkalische Phosphatasen) bestimmte man an einem Stichprobenumfang von 20 Tieren. Die freien Aminosäuren untersuchte man an einem Stichprobenumfang von 6 Tieren.

Die einzelnen Labormethoden sind ausführlich im Absatz 8.4.5 beschrieben.

8.4.4 Untersuchungen nach intravenöser Applikation von CP im Vergleich zur Kontrolle

CP wurde den Häsinnen in einer Dosis von 80 mg/kg KG genau 9 Tage und 0 Stunden nach dem Deckakt in eine Ohrvene injiziert.

Zu bestimmten Zeiten nach der CP-Applikation (1, 3, 6 und 12 Stunden, ent-

sprechend den Versuchen III/CP₁, III/CP₃, III/CP₆ und III/CP₁₂) wurde mütterliches Blut und Dottersackflüssigkeit auf Veränderungen der in Kapitel 7 beschriebenen Parameter hin untersucht.

In den Kontrollversuchen (III/NaCl₁, III/NaCl₃, III/NaCl₆ und III/NaCl₁₂) bekamen die Tiere statt CP lediglich das Lösungsmittel (4 ml physiologische NaCl-Lösung/kg KG) intravenös injiziert. Ansonsten wurde die gleiche Versuchsanordnung gewählt.

Der Stichprobenumfang betrug in Versuchsserie III n = 48 Tiere. In jeden einzelnen Versuch wurden 6 Tiere genommen. Die Bestimmung der Aminosäuren erfolgte an 5 Tieren pro Einzelversuch.

8.4.5 Labormethoden

8.4.5.1 pH und Blutgase

Zur Bestimmung des pH-Wertes und der Blutgase pCO₂ und pO₂ wurden etwa 0,5 ml arterielles Blut, bzw. das Material einer Keimanlage luftblasenfrei mit einer heparinisierten Spritze gewonnen.

Eine Heparinisierung der Dottersackflüssigkeit ist wegen des Fibrinogengehaltes, wie sich bei Vorversuchen zeigte, unumgänglich.

Die Proben wurden luftdicht verschlossen und bis zur Analyse im Kühlschrank bei 0 - 4° C gelagert. Bei Kühlschranktemperaturen ist die Glykolyse praktisch vollständig gehemmt, so daß es nicht durch Bildung von Milchsäure zu pH-Verschiebungen kommt (Rick, 1974). Wegen des luftblasenfreien Verschlusses hat CO₂ keine Möglichkeit, sich mit der Außenluft zu äquilibrieren. Der pH der Probe kann unter den beschriebenen Vorsichtsmaßnahmen bis zu etwa 2 Stunden konstant gehalten werden.

Die Messungen erfolgten auf einem pH-Blutgas-Mikroanalysator (Gas Check AVL-937, Fa. AVL AG, Schaffhausen), der im Dauerklinikbetrieb benutzt und gewartet wurde.

Im Gegensatz zu den bekannten, von *Astrup* beschriebenen indirekten Methoden der Blutgasmessung, konnte mit diesem Gerät nach der Methode von *Harmoncourt* (1975) alle Parameter direkt mit Hilfe von Kapillar-Glaselektroden gemessen werden.

Für eine vollständige Analyse reichten etwa 40 Mikroliter Untersuchungsmaterial. Die Analysendauer betrug mit Eichen der Elektroden und waschen und trocknen der Kapillaren 3 - 5 Minuten.

Da Kaninchen eine durchschnittliche Körpertemperatur von 39°C haben, mußten die erhaltenen Werte mit Hilfe von Tabellen umgerechnet werden. Die Meßanordnung war auf 37°C temperiert.

Auf die Berechnung der Standardbikarbonatkonzentration und des Basenüberschusses wurde bei den Kaninchen verzichtet, da die für den Menschen aufgestellten Nomogramme, aus denen diese Parameter nach Kenntnis des pH und des pCO_2 hervorgehen, nicht ohne weiteres auf Versuchstiere übertragen werden können.

8.4.5.2 Natrium, Kalium und Calcium

Die Bestimmung der Elektrolyte erfolgte im Serum des Muttertieres und im Überstand der Dottersackflüssigkeit.

Für jede Analyse benötigte man etwa 1 ml Flüssigkeit. Das Dottersackmaterial wurde wie das mütterliche Blut zentrifugiert, um Zellbestandteile zu isolieren. Die Überstände pipettierte man vorsichtig ab. Zellrückstände im Untersuchungsmaterial müssen vermieden werden, da der hohe intrazelluläre Kaliumgehalt die Werte verfälschen würde.

Die Untersuchungen wurden auf dem Flammenphotometer der Firma Eppendorf durchgeführt. Dabei werden Ionen mit einer Verdünnungsflüssigkeit zerstäubt und in eine Flamme geleitet. Die thermische Energie versetzt die Atome kurzfristig in einen angeregten energiereichen Zustand. Die Abgabe dieser Energie in Form von Licht kann als Verfärbung der Flamme wahrgenommen werden. Je mehr Atome in der Flamme vorhanden sind, um so intensiver ist diese sogenannte Emissionsstrahlung. In bestimmten Bereichen ist die Intensität der Flammenfärbung direkt proportio-

nal der Konzentration der Atome in der Untersuchungslösung (Rick, 1974).

Da jedes Atom eine charakteristische Färbung aufweist, kann die Emission des zu bestimmenden Atoms mit geeigneten Filtern gesondert gemessen werden. Der Vergleich mit einer Standardlösung erlaubt die Berechnung der gesuchten Konzentration.

Das Gerät wurde im klinischen Routinebetrieb genutzt und gewartet. Die Standardlösungen setzte man täglich neu an; außerdem erfolgten regelmäßige Qualitätskontrollen.

8.4.5.3 Gesamteiweiß

Die Gesamteiweißkonzentration wurde nach der Biuretmethode (Weichselbaum, 1946) bestimmt.

Die Reaktion beruht auf der Anlagerung von Kupferionen an die Peptidbindungen von Proteinen im alkalischen Milieu. Es entsteht ein blau-violetter Farbkomplex, dessen Intensität der Eiweißkonzentration proportional ist und photometrisch gemessen werden kann. Das Extinktionsmaximum liegt zwischen 530 und 570 nm. Die Biuretreaktion ist für Peptidbindungen spezifisch. Die übrigen stickstoffhaltigen Verbindungen geben mit Kupferionen keine Farbe (Rick, 1974).

Die Eiweißkonzentration wurde in den Überständen des zentrifugierten mütterlichen Blutes, bzw. der Dottersackflüssigkeit bestimmt.

Biuretreagenz besteht aus einer wässrigen Lösung von 0,1 N NaOH, 16 mM K-Na-Tartrat, 15 mM KJ und 6 mM Kupfersulfat.

0,1 ml Serum/Dottersackflüssigkeit wurden mit 5 ml der Biuretlösung zusammengebracht und nach 30 Minuten mit einem Standard bei 546 nm gegen reines Biuretreagenz photometrisch gemessen. Für leicht hämolytische Seren setzte man einen Leerwert, bestehend aus einer alkalischen K-Na-Tartrat-Lösung und Serum an. Die Extinktion des Leerwertes wurde von der Extinktion der hämolytischen Probe subtrahiert. Auf diese Weise konnten die Einflüsse des freien Hämoglo-

bins korrigiert werden.

Die Reagenzien wurden als Biochemica-Test-Combination der Fa. Boehringer Mannheim GmbH, Best.-Nr.: 15899, bezogen.

8.4.5.4 Glukose

Die Bestimmung der Glukosekonzentration erfolgte enzymatisch mit Glukose-oxidase.

Glukose wird durch dieses spezifische Enzym zu Glukonolacton oxydiert, welches in wässriger Lösung in Glukonsäure übergeht. Hierbei entstehen Wasserstoffperoxyd, das in Gegenwart von Peroxydase mit einem Farbstoff zu einer grünlich gefärbten Verbindung reagiert. Die Intensität des Farbstoffes ist der Glukosekonzentration in weiten Bereichen proportional und kann bei 578 nm photometrisch gemessen werden.

Für die Untersuchungen wurden 0,1 ml Vollblut mit 1,0 ml Uranylacetat (Urac^0) enteiweißt. Zur Bestimmung mußten 0,2 ml des Überstandes, der bis zu 24 Stunden im Kühlschrank aufbewahrt werden kann, mit 5,0 ml des Puffer-enzymgemisches versetzt werden. Nach 40 Minuten maß man die Extinktion gegen reines Pufferenzymgemisch und verglich sie mit einem Standard.

Das Pufferenzymgemisch setzt sich folgendermaßen zusammen:

100 mM Phosphatpuffer, Peroxydase - 0,8U/ml, Glukoseoxydase - 10 U/ml, und 1,0 mg ABTS/ml (= 2,2 - Azino-di(3-äthyl-benzthiazolinsulfonsäure-(6))-diammonium).

Die Reagenzien wurden als Biochemica-Test-Combination, Glukose-GOD-Perid⁰-Methode, Best.-Nr.: 15756, der Fa. Boehringer-Mannheim GmbH bezogen.

8.4.5.5 Lactat

Die Lactatkonzentration wurde enzymatisch bestimmt. L-Lactat wird durch NAD^+ und Lactatdehydrogenase zu Pyruvat oxidiert. Dabei entsteht NADH

und H^+ . Gibt man NAD^+ im Überschuß hinzu und fängt die Reaktionsprodukte Pyruvat und H^+ ab, so kann die gebildete Menge an NADH als Meßgröße für die Lactatkonzentration herangezogen werden.

Nach Enteiweißung von 0,5 ml der zu untersuchenden Probe mit 1,0 ml eiskalter Perchlorsäure (etwa 0,6 N), brachte man 0,2 ml des Überstandes mit 2,0 ml eines Puffer-Hydrazingemisches zusammen. Außerdem wurden 0,2 ml NAD^+ (27 mM) und 0,2 ml LDH (- 650 U/ml) hinzugegeben und das Reaktionsgemisch genau eine Stunde bei $25^{\circ}C$ im Wasserbad inkubiert. Das Puffer-Hydrazin-Gemisch bestand aus 0,5 M Glycinpuffer (pH = 9,0) und 0,4 M Hydrazin.

Die NADH-Konzentration wurde bei 366 nm photometrisch gemessen und mit einem Leerwert verglichen. Die Konzentration c von L-Lactat berechnete sich nach folgender Formel:

$$c = \frac{MG \cdot V}{\epsilon \cdot d \cdot 10 \cdot v} \cdot F \cdot \Delta E \quad (\text{mg/100 ml})$$

$$\text{wobei } F = \frac{(b \cdot G \cdot Fl) + P}{b}$$

MG = Molekulargewicht von Lactat (= 90,1)
 ϵ = Extinktionskoeffizient von NADH bei 366 nm (= $3,3 \text{ cm}^2/\mu\text{Mol}$)
 d = Schichtdicke der Küvette (= 1 cm)
 v = Volumen des Überstandes nach Enteiweißung (= 0,2 ml)
 V = Summe der angegebenen Volumina (= 2,42 ml)
 F = Verdünnungsfaktor
 ΔE = Extinktionsdifferenz zwischen Probe und Leerwert
 b = Eingesetzte Probenmenge (= 0,5 ml)
 G = spezifisches Gewicht (Blut = 1,06, DS-Flüssigkeit = 1,013)
 Fl = Flüssigkeitsgehalt (Blut = 80%, DS-Flüssigkeit = 100%)
 P = Menge der zur Enteiweißung herangezogenen Perchlorsäure (= 1,0 ml)

Bei Anwendung dieser Methode ergab sich für die Lactatkonzentration:

$$c_{\text{Blut}} = 94,1 \Delta E_{366 \text{ nm}} \quad (\text{mg/100 ml})$$

$$c_{\text{DS}} = 99,5 \Delta E_{366 \text{ nm}} \quad (\text{mg/100 ml})$$

Die oben beschriebene Methode entspricht den Angaben von *Gutmann und Wahlefeld (1974)*.

Die Reagenzien wurden als Testkombination der Fa. Boehringer Mannheim, Best.-Nr.: 15972, bezogen.

8.4.5.6 Aktivität der alkalischen Phosphatasen

Die alkalischen Phosphatasen sind Phosphatester spaltende Enzyme. Zur Aktivierung können Phosphatester als Substrat verwendet werden, wobei die Umsatzrate des Reaktionsproduktes als Maß für die Enzymaktivität herangezogen wird.

In Anlehnung an die Angaben von *Bessey et al.* (1946) wurde in diesen Versuchen p-Nitro-phenylphosphat eingesetzt, welches durch die im Serum vorhandenen Phosphatasen in Phosphat und p-Nitrophenol gespalten wurde. Diese Methode ist für alle alkalischen Phosphatasen spezifisch. Im alkalischen Milieu liegt p-Nitrophenol als gelb gefärbtes p-Nitrophenolat vor, welches bei 405 nm photometrisch gemessen werden kann. Für die Berechnung der Enzymaktivität zieht man die durchschnittliche Extinktionszunahme $\Delta E/\text{min}$ heran, die der Enzymaktivität in weiten Bereichen proportional ist.

0,05 ml Probenflüssigkeit wurden mit 2,0 ml Reaktionslösung versetzt. Nach genau 1, 2 und 3 Minuten konnte die Extinktion gemessen und die durchschnittliche Extinktionszunahme berechnet werden.

Die Berechnung der Volumenaktivität erfolgte nach folgender Formel:

$$\text{Volumen-Aktivität} = \frac{1\,000 \cdot V}{t \cdot \epsilon \cdot d \cdot v} \Delta E \quad (\mu\text{Mol/min l})$$

ϵ = Extinktionskoeffizient von p-Nitrophenol bei 405 nm (= 18,5 cm²/μMol)
 d = Schichtdicke der Küvette (= 1 cm)
 v = Volumen der eingesetzten Probe (= 0,05 ml)
 V = Summe der eingesetzten Volumina (= 2,05 ml)
 t = Zeit der Messung (hier t = 1 Minute)

Da 1 uMol/min l = 1 U/l ergab sich bei der oben beschriebene Methode für die Aktivität der alkalischen Phosphatasen:

$$A = 2216 \cdot \Delta E_{405 \text{ nm}} \quad (\text{U/l})$$

Die Reagenzien wurden von der Fa. Boehringer Mannheim, Best.-Nr.: 15987, bezogen.

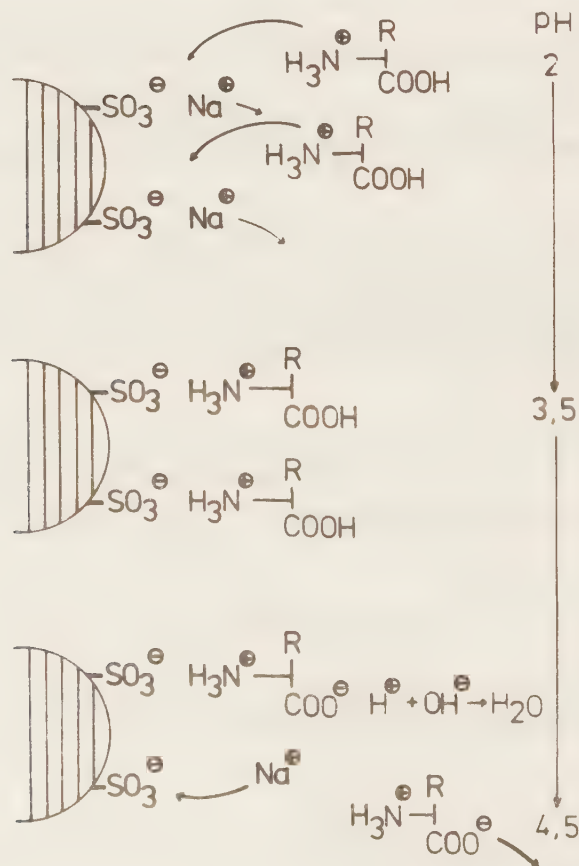
8.4.5.7 Freie Aminosäuren

Die freien Aminosäuren wurden mit Hilfe der Ionenaustauschchromatographie nach der Methode von *Spackman et al.* (1958) bestimmt.

Ionenaustauscher sind Verbindungen, die selber Ionen enthalten und diese unter standardisierten Bedingungen gegen andere Ionen aus der umgebenden Lösung austauschen. Sie bestehen aus miteinander vernetzten makromolekularen Ketten, in die polare ionenbindende Gruppen eingeführt sind.

Während einerseits bei der Ionisation sogenannte Festionen mit dem polymeren Gerüst verbunden bleiben, entstehen Gegenionen, die frei in Lösung sind und gegen andere ausgetauscht werden können. Je nach ihrer Eigenschaft spricht man von Kationen- bzw. von Anionenaustauschern. Im allgemeinen besitzen die Ionenaustauscher eine "ionische Selektivität", das heißt, sie können

Abbildung 9 - Schematische Darstellung der Funktion eines Ionenaustauschers (siehe auch Text)



zwischen den verschiedenen Gegenionen in der umgebenden Lösung unterscheiden. Diese Selektivität richtet sich nach dem Vernetzungsgrad der molekularen Gruppen. Je höher der Vernetzungsgrad, um so besser ist die Unterscheidungsmöglichkeit unter den Gegenionen. Die Austauschgeschwindigkeit der verschiedenen Ionen (in dieser Arbeit der Aminosäuren) richtet sich nach deren Dissoziationsfähigkeit. Die Trennung wird weiter beeinflusst vom pH und der Durchflußgeschwindigkeit des Puffers; außerdem spielt die Temperatur des Systems und die chemische Beschaffenheit der Kunstharzsäule (= eigentlicher Ionenaustauscher) eine Rolle.

In Abbildung 9 (Seite 48) ist zur Verdeutlichung die Funktion eines Ionenaustauschers schematisch dargestellt. Es handelt sich in diesem Beispiel um einen Kationenaustauscher mit SO_3^- -Resten. Alle SO_3^- -Gruppen sind mit Na^+ -Ionen beladen. Werden nun zum Beispiel bei einem pH von 2 Aminosäuren aufgetragen, so liegen diese als Kationen vor und lagern sich an die SO_3^- -Gruppen an. Die Na^+ -Ionen werden in diesem Fall also gegen die Aminosäuren ausgetauscht. Anschließend wird mit einem Puffer, der einen höheren pH-Wert hat, eluiert. Die Carboxylgruppen verlieren damit ihre Säureform und gehen in die Basenform über. Die Aminosäuren werden nur noch durch schwache polare Kräfte auf Grund ihres Dipolcharakters an die SO_3^- -Gruppen gehalten. Die Natriumionen des Puffers können nun wieder die Aminosäuren verdrängen.

Die Reihenfolge der Verdrängung (und damit die Trennung) hängt im wesentlichen von den pK_1 - Werten der Carboxylgruppen ab, so daß die Aminosäuren als Funktion der Zeit die Säule einzeln wieder verlassen.

Nach Trennung der Aminosäuren müssen diese im Analysator chemisch nachgewiesen werden.

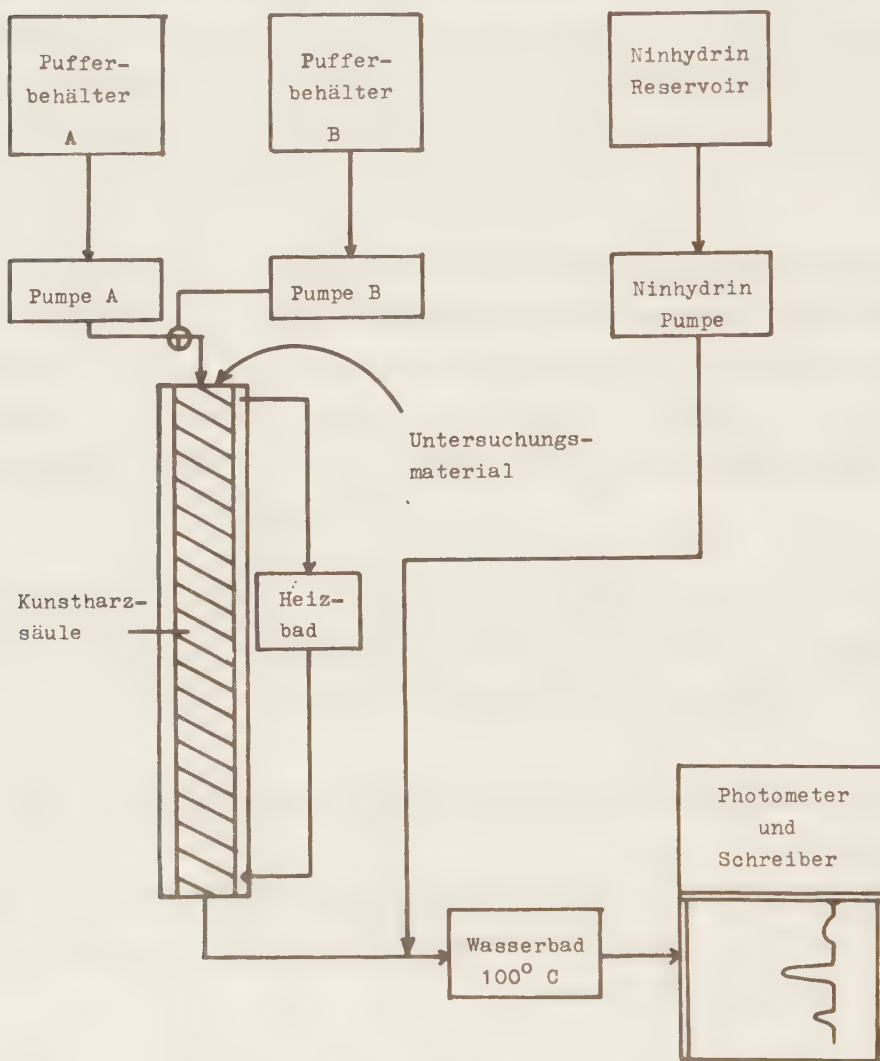
Neben der Formoltitration nach *Sørensen* und der Umsetzung mit salpetriger Säure nach *van Slyke* ist die Ninhydrinreaktion eine Nachweismethode für Aminosäuren (*Rapoport, 1973*).

Ninhydrin ist ein Indan-1,2,3-trion-2-hydrat. Es oxydiert Aminosäuren zu Amoniak, CO_2 und einem Aldehyd. Dabei entsteht Dihydrid, welches mit Amoniak zu einem Farbstoff kondensiert. Die Intensität des Farbstoffes ist der Konzentration der Aminosäuren proportional und kann photometrisch gemessen werden. Die Reaktion benötigt eine freie Aminogruppe in alpha-Stel-

lung und eine Carboxylgruppe. Sie ist damit spezifisch für alle freien alpha-Aminosäuren (Rapoport, 1973).

Die Untersuchungen wurden auf automatischen Aminosäureanalysatoren durchgeführt. Die sauren und neutralen Aminosäuren trennte man auf dem Beckman Multichrom der Fa. Beckman Instruments GmbH. Die basischen Aminosäuren wurden auf dem Biocal BC 200 der Fa. Biocal bestimmt.

Abbildung 10 - Schematischer Aufbau eines Aminosäure-analysators



Die Aminosäurelösung wurde in die Säule gegeben, welche von der Pufferlösung A in konstanter Geschwindigkeit und bei gleichbleibender Temperatur

durchströmt wird. Nach einer bestimmten Zeit wechselte man den Puffer, und die Aminosäuren verließen nacheinander die Säule, wobei sie direkt mit dem Ninhydrinreagenz reagierten (siehe auch Abbildung 10, Seite 50). In einer Durchflußküvette wurde anschließend die Extinktion gemessen und mit einem Recorder aufgezeichnet.

Das Absorptionsmaximum liegt für die meisten Aminosäuren bei 570 nm. Nur Prolin und Hydroxyprolin ergeben einen Farbstoff, der bei 440 nm gemessen werden muß.

Die Aminosäuren wurden in den Analysen dieser Arbeit nach folgenden Programmen getrennt:

	<u>saure und neutrale AS</u>	<u>basische AS</u>
Gerät	<i>Beckman Multichrom</i>	<i>Biocal BC 200</i>
Säule	<i>Beckman M 72</i>	<i>Bio-rad Aminex A5</i>
Puffer A	<i>0,2 N Na-Citrat</i> <i>(pH = 3,18)</i>	<i>0,38 N Na-Citrat</i> <i>(pH = 4,26)</i>
Temperatur	<i>30 °C</i>	<i>32 °C</i>
Zeit	<i>170 min</i>	<i>140 min</i>
Puffer B	<i>0,2 N Na-Citrat</i> <i>(pH = 4,25)</i>	<i>0,35 N Na-Citrat</i> <i>(pH = 5,28)</i>
Temperatur	<i>55 °C</i>	<i>55 °C</i>
Zeit	<i>110 min</i>	<i>100 min</i>
Pufferdurchflußrate	<i>50 ml/h</i>	<i>60 ml/h</i>
Ninhydrindurchflußrate	<i>25 ml/h</i>	<i>40 ml/h</i>
Regenerierung	<i>0,4 N NaOH</i> <i>für 30 min</i>	<i>0,4 N NaOH</i> <i>für 30 min</i>
Papiervorschub	<i>150 mm/h</i>	<i>150 mm/h</i>
Äquilibration	<i>mit Puffer A</i>	<i>mit Puffer A</i>

Die gewonnenen Extinktionskurven wurden ausgewertet, indem man sie mit einem Standard- oder Eichchromatogramm verglich. Dieses gab an, zu welchen Zeitpunkten und in welcher Reihenfolge die Aminosäuren bei einem bestimmten Programm eluiert wurden. Außerdem konnten Absorptionsintensitäten bestimmt und so auf die Konzentrationen der in der Probe enthaltenen Aminosäuren geschlossen werden.

Die Berechnung der einzelnen Aminosäuren erfolgte nach der H x W -Methode. Hierbei wurde die Höhe H und die Breite W der Peaks gemessen. Die Höhe ergab sich aus der Extinktion auf der Ordinate. Die Breite wurde durch Zählung der Punkte über der halben Höhe gemessen (der Recorder zeichnet statt einer Extinktionskurve in regelmäßigen zeitlichen Abständen Punkte, die zur Erleichterung der Auswertung dienen).

Die Auswertung von Doppelpeaks, bei denen das Tal nicht bis unterhalb der Halbierungslinie reichte, konnte die Berechnung durchgeführt werden, indem man nur den Anstieg, bzw. beim zweiten Peak nur den absteigenden Teil ausählte. Das Ergebnis mußte man verdoppeln. Bei einem nur als Schulter verlaufenden Kurventeil war die Auswertung nur ungenau durchzuführen. Hierbei konnten allenfalls Richtwerte bestimmt werden.

Die Aminosäurekonzentration ergab sich nach folgender Formel:

$$AS_x (\mu\text{Mol}) = \frac{H \cdot W}{C_{HW}}$$

C_{HW} war eine Konstante, die dem H x W - Wert für 1 μMol der gesuchten Aminosäure entsprach. Sie wurde mit Hilfe des Standardchromatogramms ermittelt.

Zur Analyse wurden die Proben zunächst mit 3%-iger Sulfosalicylsäure enteiweißt. 1 ml Plasma, bzw. Dottersackflüssigkeit, versetzte man mit 4 ml der Säure und zentrifugierte nach kräftigem Schütteln 10 Minuten bei 3000 U/min. Der Überstand wurde bis zur Analyse bei -80°C gelagert.

Bei sauberer Arbeitsweise lassen sich die Ergebnisse bis auf 2 - 3% reproduzieren (Firmenangabe des Herstellers des Aminosäureanalysators).

Die Analysatoren wurden im täglichen Routinebetrieb benutzt und gewartet. Mit den oben beschriebenen Programmen ließen sich die freien Aminosäuren im Blut und in der Dottersackflüssigkeit des Kaninchens befriedigend auftrennen.

8.5 Statistische Bearbeitung

8.5.1 Mittelwert und Standardabweichung

In allen Versuchen wurden die Mittelwerte und Standardabweichungen nach folgenden Formeln berechnet:

$$\text{Mittelwert } \bar{x} = \frac{1}{n} \cdot \sum_{i=1}^n x_i$$

$$\text{Standardabweichung } s_x = \pm \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

8.5.2 Versuchsserie I

8.5.2.1 t-Test (Vergleich von Mittelwerten)

Der t-Test wird für den Vergleich zweier Mittelwerte $\bar{x}_1$ und $\bar{x}_2$ mit zufällig abweichenden Varianzen s_1^2 und s_2^2 herangezogen.

Diese Bedingungen waren beim Vergleich der Fetengewichte und der Scheitelsteißlängen in Versuchsserie I erfüllt.

Mit Hilfe der Mittelwerte, der Anzahl der Mittelwerte und den Standardabweichungen konnte t_b berechnet werden.

$$t_b = \frac{|\bar{x}_1 - \bar{x}_2|}{s_d} \sqrt{\frac{n_1 \cdot n_2}{n_1 + n_2}}$$

$$\text{mit } s_d = \sqrt{\frac{s_1^2 \cdot (n_1 - 1) + s_2^2 \cdot (n_2 - 1)}{n_1 + n_2 - 2}}$$

War $t_b < t_{Tp}$ (t_{Tp} = Tafelwert t für die Irrtumswahrscheinlichkeit p), mußte die Nullhypothese H_0 angenommen werden. Das bedeutete, daß die Abweichung der Mittelwerte x_1 und x_2 zufällig war.

Im umgekehrten Falle ($t_b > t_{Tp}$) konnte die Alternativhypothese angenommen werden. Es bestanden signifikante (wesentliche) Unterschiede zwischen den beiden Stichproben.

Der Tafelwert für t kann bei einem Freiheitsgrad $d_f = n_1 + n_2 - 2$ und der Irrtumswahrscheinlichkeit p in der Literatur nachgesehen werden. n_1 und n_2 geben dabei den Stichprobenumfang der einzelnen Meßreihen an.

Die Irrtumswahrscheinlichkeit p wurde in den oben genannten Versuchen (Versuchsserie I) auf 0,01, bzw. 1% festgelegt.

8.5.2.2 2 mal 2 Felder χ^2 (Chi-Quadrat) - Test

Im 4 Felder Test (auch Unabhängigkeitstest genannt) werden zwei Stichproben bezüglich des Unterschiedes in einem bestimmten Merkmal untersucht.

In Versuchsserie I wurden die Merkmale "mißgebildet", bzw. "nicht mißgebildet" und "resorbiert", bzw. "nicht resorbiert", auf ihre Abhängigkeit von der CP-Behandlung und einer Dosissteigerung untersucht.

Die Stichproben wurden hierzu in ihre Positivvarianten, zum Beispiel mißgebildete Feten, und in ihre Negativvarianten, zum Beispiel nicht mißgebildet, aufgeteilt (siehe Abb. 10).

	Merkmalsalternative		(Summe)
	+	-	
Stichprobe 1 :	a_1	b_1	N_1
Stichprobe 2 :	a_2	b_2	N_2
	N_a	N_b	N

Abbildung 11 - Aufteilung der Positivvarianten (a) und Negativvarianten (b) beim 4-Felder χ^2 - Test

χ^2 berechnet man dann nach folgender Formel:

$$\chi^2 = \frac{N^2}{N_a \cdot N_b} \left(\frac{a_1^2}{N_1} + \frac{a_2^2}{N_2} - \frac{N_a^2}{N} \right)$$

Überschritt der berechnete χ^2 - Wert den kritischen Tabellenwert mit dem Freiheitsgrad $d_f = 1$ und der Irrtumswahrscheinlichkeit p (in Versuchsserie I $p \leq 0,05$), war die Nullhypothese abzulehnen, der Unterschied also als signifikant anzusehen.

8.5.3 Versuchsserie II und III

8.5.3.1 Rangsummentest zum Vergleich von Mittelwerten

Beim Rangsummentest werden wie beim t-Test Mittelwerte miteinander verglichen. Allerdings kann der Rangsummentest auch angewandt werden, wenn die Varianzen signifikante Unterschiede zeigen, oder wenn der Unterschied der Varianzen nicht bekannt ist.

Die Versuchsergebnisse wurden der Größe nach geordnet und mit einer Rangzahl versehen. Der kleinste Wert bekam die Rangzahl 1, der größte Wert die

Stichprobe 1	R_i	Stichprobe 2	R_i
6,89	1		
6,92	2		
6,75	3		
		7,11	4
7,12	5		
7,13	6,5	7,13	6,5
7,14	8		
7,15	9		
		7,24	10
		7,26	11
		7,30	12
R = 34,5		R = 43,5	

Abbildung 12 - Aufteilung zweier Stichproben nach dem Rangsummentest (in diesem Beispiel handelt es sich pH-Werte)

Rangzahl n . Die Rangzahlen wurden addiert und mit Tabellenwerten verglichen. Lagen die berechneten Rangsummen außerhalb der in der Tabelle für eine Irrtumswahrscheinlichkeit (hier von 0,05) angegebenen Vertrauensgrenzen, so war die Abweichung der beiden Stichproben signifikant.

In einem Beispiel (siehe Abb. 12, Seite 55) wurden in zwei Stichproben pH-Werte gemessen. Stichprobe 1 und 2 wurden der Größe nach geordnet. Die Rangsummen betrugen 34,5 und 43,5. Für gleiche Werte bestimmte man den Mittelwert der dazugehörigen Rangsummen. Die Vertrauensgrenzen lagen bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5% und $n_1 = n_2 = 6$ bei 26 und 58. Die Abweichung der im Beispiel aufgezeigten Stichproben war somit als zufällig anzusehen, weil die Rangsummen innerhalb der Vertrauensgrenzen lagen. Es bestand kein signifikanter Unterschied.

8.5.3.2 F-Test zum Vergleich von Varianzen

Sind zwei Stichproben unabhängig voneinander und stammen sie aus normalverteilten Grundgesamtheiten, so können die Varianzen (somit auch die Standardabweichungen) der beiden Stichproben mit Hilfe des F-Testes auf Unterschiede geprüft werden.

Die Nullhypothese (s_1 und s_2 unterscheiden sich nur zufällig voneinander) wurde mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p = 0,05$ angenommen, wenn der nach der Testgröße F ,

$$\text{mit } F = s_1^2 / s_2^2 \quad (\text{wobei } s_1 > s_2),$$

berechnete Wert F_b kleiner als der Tafelwert F_T für p war. Die Freiheitsgrade betragen im allgemeinen:

$$f_1 = n_1 - 1 \quad \text{und} \quad f_2 = n_2 - 1,$$

wobei n_1 und n_2 den Umfang der jeweiligen Stichproben angibt.

8.5.3.3 Wilcoxon-Test für Paardifferenzen - Vergleich von verbundenen Stichproben

Der Paardifferenzentest von Wilcoxon wird angewandt, wenn zwei verbundene, oder paarige Stichproben miteinander verglichen werden.

Im Rahmen dieser Untersuchungen wurden Unterschiede zwischen Werten im mütterlichen Blut und Dottersackwerten (jeweils am gleichen Tier) mit Hilfe dieses

Testes geprüft. Zwischen jedem Wertepaar bildete man zunächst die Differenzen und ordnet sie ihrem Betrage nach. Jede Differenz erhielt einen Rangplatz, wobei Differenzen mit dem Werte 0 fortgelassen wurden. Die verbliebenen Werte bezeichnete man als Reststichprobe. Fand man bei mehreren Differenzen den gleichen Betrag, wurde die Quersumme der zugehörigen Rangplätze gebildet. Anschließend addierte man getrennt die Rangplätze für die negativen, bzw. die positiven Differenzen und erhielt so die Rangsummen R_+ und R_- . Als Kontrolle diente:

$$R_+ + R_- = \frac{n \cdot (n + 1)}{2} .$$

Anhand eines Beispielles soll die Anwendung dieses Testes verdeutlicht werden.

Tier Nr.	mütterl. Werte (mval/l)	DS - Werte (mval/l)	d_i	Rang
1	3,2	6,2	3,0	5 -
2	3,7	7,8	4,1	6 -
3	3,4	5,6	2,2	3 -
4	4,0	4,8	0,8	1,5 -
5	3,9	6,3	2,4	4 -
6	4,6	4,6	0	
7	4,8	4,0	0,8	1,5 +

Abbildung 13 - Anwendungsbeispiel des Wilcoxon-Paardifferenzentests (hier werden die Kalium-Werte zwischen Mutter und Embryo auf Unterschiede geprüft)

Es ergab sich für $R_- = 19,5$ und für $R_+ = 1,5$. Die Reststichprobe betrug $n = 6$, weil eine Differenz 0 war und der Wert somit nicht verwertet wurde.

Die Testgröße T_b entspricht dem kleineren der beiden Rangsummen. In diesem Fall ist somit $T_b = R_+ = 1,5$. Die Nullhypothese wird verworfen, wenn T_b den Tabellenwert T_T für eine Irrtumswahrscheinlichkeit (hier $p \leq 0,05$) nicht überschreitet. Bei einseitiger Fragestellung, $n = 6$ und $p = 0,05$ betrug $T_T = 2$. T_b lag damit unter T_T , die Unterschiede im Beispiel sind deswegen signifikant.

9. ERGEBNISSE

9.1 Übersicht

CP erwies sich nach intravenöser Applikation am 9. Tag der Gestation beim Kaninchen (weiße Neuseeländerinnen) als embryotoxisch.

Hohe Dosen verursachen zusätzlich eine Wachstumsretardierung bei den überlebenden Feten (Versuchsserie I).

Da die embryotoxische Wirkung von CP nach Applikation von 80 mg/kg KG am stärksten war, entschloß man sich, diese Dosierung in Versuchsserie III, vor den Untersuchungen des mütterlichen Blutes und der Dottersackflüssigkeit anzuwenden.

Zur Gewinnung von Dottersackflüssigkeit hat sich folgende Narkosetechnik als günstig erwiesen (Versuchsserie II):

Schnelles Anfluten des Narkosegases mit hoher Äther-Konzentration (ca. 24 Vol%), Äther-Preßluft als Inhalationsgas und Intubation der Versuchstiere.

Nach Applikation embryotoxischer Dosen von CP beim schwangeren Kaninchen kam es sowohl beim Muttertier, als auch in der Dottersackflüssigkeit zu Veränderungen im Säure-Basenhaushalt, im Sauerstoffpartialdruck und in der Konzentration verschiedener Elektrolyte. Außerdem wurde die Konzentration einzelner Aminosäuren, sowie das Konzentrationsgefälle einiger Aminosäuren zwischen Mutter und Embryo durch CP beeinflusst.

Schwerwiegende Veränderungen der Gesamteiweiß- und Glukosekonzentration konnten mit den hier aufgezeigten Methoden in der Dottersackflüssigkeit nicht nachgewiesen werden.

Die Veränderungen traten besonders gehäuft 3 und 6 Stunden nach Applikation von CP auf (Versuchsserie III).

9.2 VERSUCHSSERIE I - Teratologische Untersuchungen nach intravenöser Applikation von Cyclophosphamid

In Versuchsserie I wurden drei verschiedene Dosen CP auf ihre teratogene und embryotoxische Wirkung geprüft und mit einer Kontrolle verglichen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 2 zusammengefaßt:

DOSIS (i.v.)	KON- TROLLE	20 mg/kg	40 mg/kg	80 mg/kg
BEHANDELTE MUTTERTIERE	12	11	11	14
ÜBERLEBENDE MUTTERTIERE	12	11	10	11
IMPLANTATIONEN	113 (100%)	99 (100%)	103 (100%)	108 (100%)
RESORPTIONEN	18 (15,9%)	25 (25,3%)	34 *) (33,0%)	90 **) (83,3%)
LEBENDE FETEN	95	73	67	15
TOTE FETEN	-	1	2	3
MISSGEBILDETE FETEN	3	17	19	5
MISSBILDUNGSRATE	2,7%	17,2%	18,5%	4,6%
MISSBILDUNGS- FREQUENZ	3,2%	23,3% *)	28,4% *)	33,3% *)
MITTLERES GEWICHT DER FETEN (g)	33,4	35,1	38,1	24,0 *)
MITTLERE SCHEITEL- STEISSLÄNGE D.FETEN (cm)	9,1	8,8	9,1	7,6 *)

Tabelle 2 - Ergebnisse der Versuchsserie I - Resorptionsrate und Mißbildungs-
frequenz (*) sind gegenüber der Kontrolle signifikant
erhöht; die Anzahl der Resorptionen (+) nach Gabe von 80 mg
CP/kg KG ist gegenüber der 20- und 40 mg-Serie ebenfalls signi-
fikant erhöht.
Das Gewicht und die Scheitelsteißlängen der lebenden Feten sind
nach Gabe von 80 mg CP/kg KG (*) gegenüber allen anderen Serien
signifikant erhöht. ($p \leq 1\%$)

Im Kontrollversuch wurde 12 trächtigen Häsinnen am 9. Tag der Gestation 4 ml physiologische NaCl-Lösung/kg Körpergewicht (KG) in die Ohrvene injiziert.

Alle Muttertiere überlebten bis zur Untersuchung am 28. d.p.c.. Aus den insgesamt 113 Implantationen entwickelten sich 95 lebende Feten. Tote Feten konnten nicht registriert werden. 18 Implantationen (= 15,9%) bildeten sich auf den verschiedenen Entwicklungsstufen zurück und imponierten als Resorptionen.

Die Mißbildungsrate, als prozentuales Verhältnis der Anzahl mißgebildeter Feten zur Anzahl der Implantationen, betrug 2,7%. Die Mißbildungsfrequenz, als prozentuales Verhältnis der Anzahl mißgebildeter Feten zur Anzahl lebender Feten, belief sich auf 3,2%.

Es traten lediglich bei drei Feten Skelettmißbildungen im Bereich des Sternums, in Form einer angedeuteten Spaltbildung sowie einer Aplasie des 6. Segmentes, im Bereich der Halswirbelsäule (HWS) und Brustwirbelsäule (BWS), in Form von Dysplasien einzelner Wirbelkörper, auf (siehe Tab.3, Seite 64).

Das Geburtsgewicht der Feten lag bei durchschnittlich 33,4g. Die Scheitelsteißlänge (SSL) ergab einen Mittelwert von 9,1 cm. Vergleicht man das mittlere Gewicht und die mittlere SSL der mißgebildeten Feten mit denen der nicht mißgebildeten Feten, so sind die geschädigten Tiere um durchschnittlich 10,7g leichter und um 1,4 cm kürzer als die gesunden Neugeborenen (siehe Tab. 4, Seite 64 und Abb. 19 a/b, Seite 65).

Im Versuch I/1 wurden 11 Muttertiere mit 20 mg CP/kg KG behandelt. Als Lösungsmittel diente wie in allen Versuchen physiologische NaCl-Lösung.

Alle Muttertiere überlebten bis zum 28. d.p.c.. Aus 99 Implantationen entwickelten sich 73 lebende Feten. Ein Fet wurde tot geboren. Die restlichen 23 Implantationen (= 25,3%) imponierten als Resorptionen.

17 der 73 lebenden Feten waren mißgebildet, woraus sich eine Mißbildungsrate von 17,2% und eine Mißbildungsfrequenz von 23,3% ergab. Der Unterschied der Mißbildungsfrequenz zur Kontrolle war signifikant ($p = 1\%$).

Die Mißbildungen betrafen nur das Skelettsystem, wobei die BWS und das Sternum am häufigsten geschädigt waren. Es wurden angedeutete Spaltbildungen, Doppelbildungen, Hypoplasien und Dysplasien beobachtet. Daneben fand man Hypoplasien der HWS, Ossifikationsstörungen der Schädelkalotte und Synostosen der Rippen (siehe Tab. 3, Seite 64).

Während das durchschnittliche Geburtsgewicht bei 35,1 g lag und damit etwas höher war, als bei der Kontrolle, lag die mittlere SSL mit 8,8 cm geringfügig unter dem bei der Kontrolle gefundenen Wert.

Die mißgebildeten Feten wogen 33,0 g im Durchschnitt und waren 8,6 cm lang, wohingegen die gesunden Tiere 35,7 g wogen und 8,9 cm lang waren (siehe Tab. 4, Seite 64 und Abb. 19 a/b, Seite 65).

Im Versuch I/2 wurden 11 Muttertiere mit 40 mg CP/kg KG behandelt, von denen 10 Tiere bis zur Untersuchung am 28. d.p.c. überlebten. Ein Muttertier starb ohne erkennbaren Grund einige Tage nach der CP-Injektion.

Man fand 103 Implantationen, aus denen sich 67 lebende Feten entwickelten. Es wurden 2 tote Feten registriert.

Die Zahl der Resorptionen war mit 34 (= 33,0%) gegenüber der Kontrolle signifikant erhöht ($p = 1\%$). Das Verhältnis der mißgebildeten Feten zu den lebenden Feten (= Mißbildungsfrequenz) war gegenüber der Kontrolle ebenfalls signifikant erhöht. Von 67 Feten waren 19 mißgebildet, woraus sich eine Mißbildungsfrequenz von 28,4% ergab. Die Mißbildungsrate betrug in diesem Versuch 18,5%.

Das Mißbildungsmuster zeigte keine wesentlichen Unterschiede zum Versuch I/2 (20 mg CP/kg KG). Das Verhältnis der Tiere mit "Doppelmißbildungen" und Mehrfachmißbildungen zu den Tieren mit einzelnen Mißbildungen war in beiden Versuchen nahezu gleich (siehe Tab. 3, Seite 64).

Es zeigten sich angedeutete Spaltbildungen und "Doppelbildungen" im Bereich der BWS und HWS, sowie eine Keilwirbelbildung im Bereich des Schwanzes. Weiterhin wurden angedeutete Doppelbildungen und Hypoplasien des Sternums, sowie Ossifikationsstörungen der Schädelkalotte gefunden. Im Gegensatz zum Versuch I/1 zeigten sich keine Fehlbildungen der Rippen.



Abb. 14 - Hypoplasie des 5. Halswirbels (Versuch I/1 - 20 mg CP/kg KG)

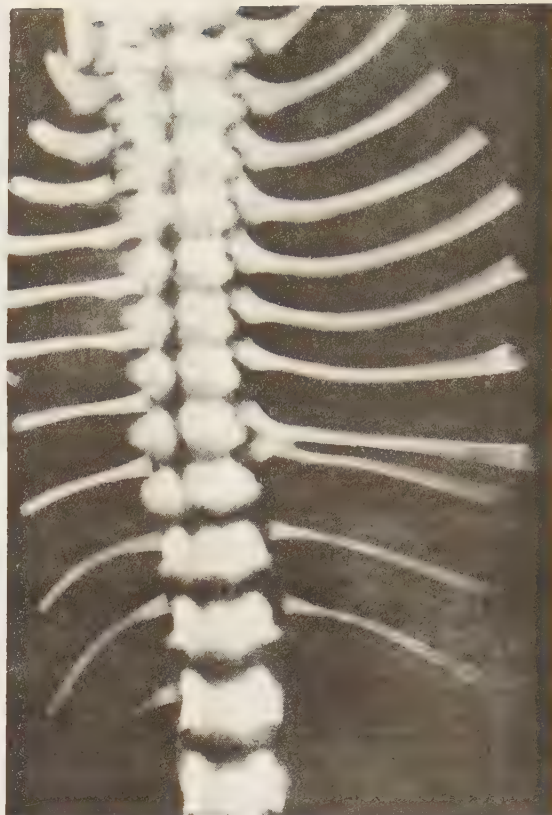


Abb. 15 - Synostose der 8. und 9. Rippe (Versuch I/1 - 20 mg CP/kg KG)



Abb. 16 - Angedeutete Spaltbildung des Sternums (Versuch I/2 - 40 mg CP/kg KG)



Abb. 17 - Dysplasie der BWS und LWS (Versuch I/3 - 80 mg CP/kg KG)

Das durchschnittliche Geburtsgewicht von 38,1 g und die mittlere SSL von 9,1 cm deuteten nicht auf eine Wachstumsretardierung der Jungtiere hin. Die mißgebildeten Feten waren durchschnittlich um 2,7 g leichter und um 0,3 cm kürzer als die gesunden Tiere (siehe Tab. 4, Seite 64 und Abb. 19 a/b, Seite 65).

Die Ergebnisse des Versuches I/3 zeigten wesentliche Unterschiede zu den vorangegangenen Versuchen. Die CP-Dosis betrug in diesem Versuch 30 mg/kg KG.

Es wurden 14 Muttertiere behandelt, von denen 3 kurz nach der Applikation starben. Es kamen somit 11 Häsinnen am 28. d.p.c. zur Untersuchung.

Aus 108 Implantationen entwickelten sich nur 15 lebende Feten. 3 Jngtiere waren tot. 90 Keime (= 83,3%) wurden resorbiert. Die Resorptionsrate war gegenüber der Kontrolle und den beiden anderen Versuchen signifikant erhöht. Die Mißbildungsfrequenz lag bei 33,3%. Der Unterschied war zur Kontrolle signifikant ($p = 1\%$). Die Mißbildungsrate war mit 4,6% sehr niedrig, was aber durch die hohe embryonale und fetale Mortalität bedingt war.

Das Mißbildungsspektrum unterschied sich von den vorhergehenden Versuchen. Die lebenden Feten zeigten zum großen Teil multiple Fehlbildungen des Skelettsystems. Das Verhältnis der Tiere mit einzelnen Mißbildungen zu den Tieren mit mehreren Mißbildungen lag bei 1 : 4 (im Vergleich - Versuch I/1 13 : 4, Versuch I/2 15 : 4). Dies war ein Hinweis auf den verschiedenen Schweregrad der Schädigungen nach der 20- und 40 mg-Dosis einerseits und der 80 mg-Dosis andererseits.

Bei den Feten dieses Versuches war die Wirbelsäulenschädigung am stärksten. In nahezu allen Abschnitten der WS zeigten sich angedeutete Spaltbildungen, Doppelbildungen, Keilwirbelbildungen und Hypoplasien. Das Sternum war bei allen mißgebildeten Feten dysplastisch. Außerdem fand sich eine Rippen-synostose (siehe auch Tabelle 3, Seite 64).

Das Gewicht lag bei 24,0 g, die SSL bei 7,6 cm. Beide Werte waren gegenüber den entsprechenden Ergebnissen der anderen Versuchen signifikant ($p = 1\%$). Sie wiesen auf eine fetale Wachstumsretardierung hin. Feten ohne Mißbildungen zeigten ein durchschnittliches Gewicht von 24,4g (Feten mit Mißbildungen : 23,3 g) und eine mittlere SSL von 7,6 cm (Feten mit Mißbildungen : 7,6 cm) (siehe Tabelle 4, Seite 64).

Tabelle 3 - Zusammenstellung der Skelettmißbildungen nach intravenöser Applikation von Cyclophosphamid (Versuchsserie I)

DOSIS (i.v.)	KON- TROLLE	20 mg/kg	40 mg/kg	80 mg/kg
KOPF	-	1	1	-
STERNUM	1	3	4	1
HWS	-	2	1	-
BWS	1	7	8	-
CWS (SCHWANZ)	-	-	1	-
KOPF/HWS	-	-	1	-
HWS/BWS	1	-	1	-
BWS/CWS	-	-	1	-
BWS/RIPPEN	-	1	-	-
BWS/STERNUM	-	3	1	1
BWS/SWS/CWS/STERNUM	-	-	-	1
HWS/BWS/CWS/STERNUM/RIPPEN	-	-	-	1
BWS/LWS/SWS/CWS/STERNUM	-	-	-	1
Anzahl der mißgebildeten Jungtiere	3	17	19	5
Tiere mit Einzelmißbildungen	2	13	15	1
Tiere mit kombinierten Skelettmißbildungen	1 (33,3%)	4 (23,5%)	4 (21,1%)	4 (80,0%)

HWS = Halswirbelsäule
BWS = Brustwirbelsäule
LWS = Lendenwirbelsäule
SWS = Sacralwirbelsäule
CWS = Coccygealwirbelsäule (Schwanz)

Tabelle 4 - Gewichte und SSL der mißgebildeten und nicht mißgebildeten Feten nach intravenöser Applikation von CP (Versuchsserie I)

DOSIS (i.v.)	KON- TROLLE	20 mg/kg	40 mg/kg	80 mg/kg
Feten mit Mißbldg.	23,1 ± 7,1	33,0 ± 9,1	32,4 ± 7,1	23,3 ± 2,9
GEWICHT (g)				
Feten ohne Mißbldg.	33,8 ± 8,0	35,7 ± 7,1	40,3 ± 8,6	24,4 ± 4,3
Feten mit Mißbldg.	7,8 ± 0,7	8,6 ± 0,7	8,4 ± 0,8	7,6 ± 0,5
LÄNGE (cm)				
Feten ohne Mißbldg.	9,2 ± 0,8	8,9 ± 0,6	9,4 ± 0,7	7,6 ± 0,5

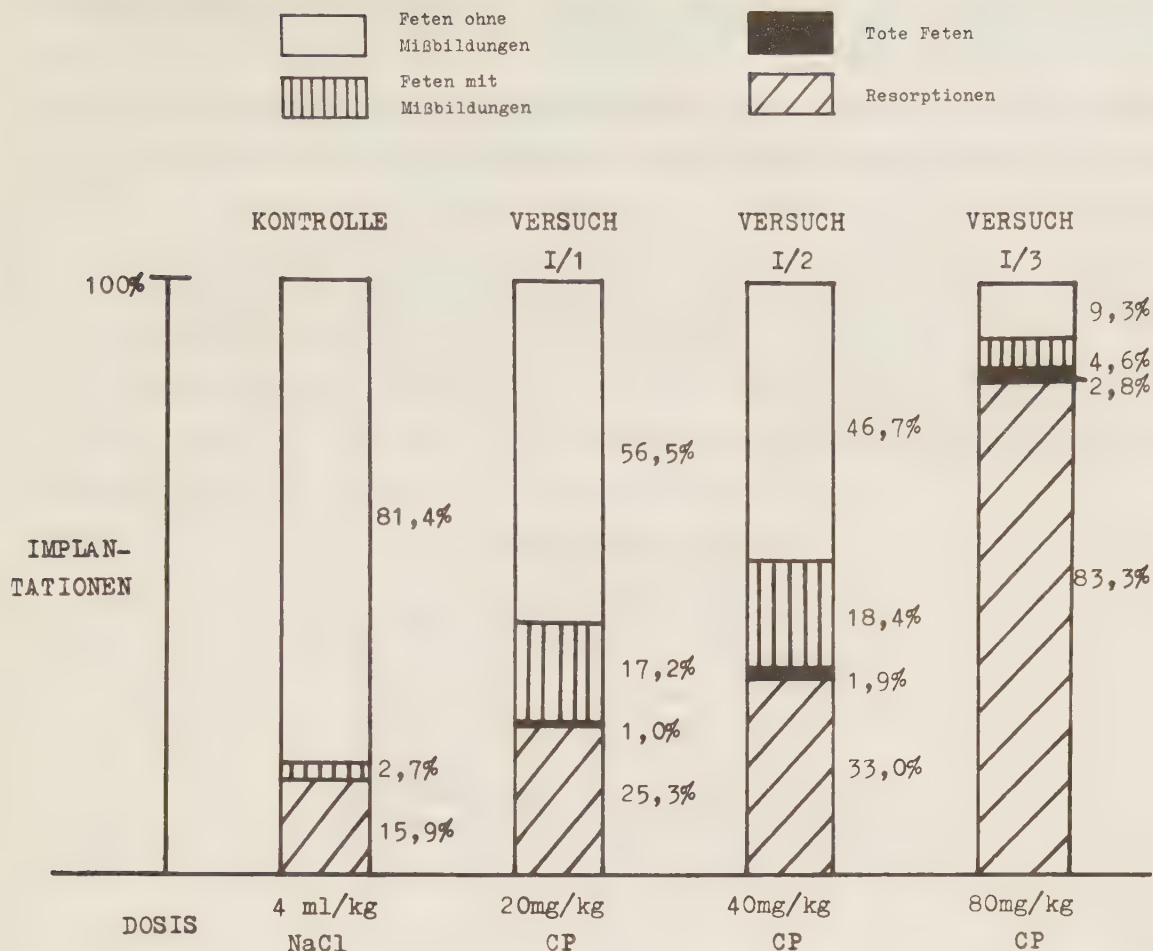


Abbildung 18 - Ergebnisse der Versuchsserie I - intravenöse Applikation von Cyclophosphamid am 9. Tag der Gestation; Untersuchungen am 28. Tag der Gestation

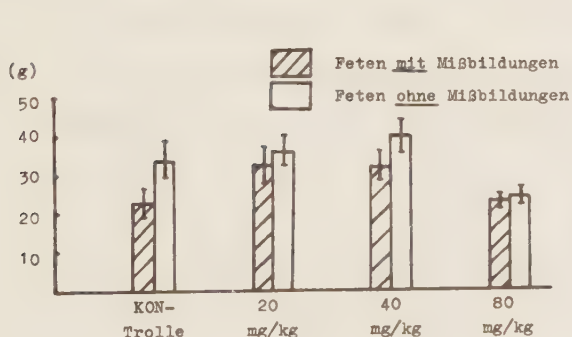


Abb. 19 a



Abb. 19 b

Abbildungen 19 a/b - Gegenüberstellung der Gewichte und SSL der fehlgebildeten und nicht fehlgebildeten lebenden Feten der Versuchsserie I (i.v. Applikation von Cyclophosphamid am 9. d.p.c.; Untersuchungen am 28. d.p.c.)

9.3 VERSUCHSSERIE II - Standardisierung der Narkose und Beatmungstechnik

In Versuchsserie II wurden drei verschiedene Narkosetechniken in ihrer Auswirkung auf den pH und die Blutgase $p\text{CO}_2$ und $p\text{O}_2$ des Kaninchens untersucht.

Im Kontrollversuch untersuchte man 5 ausgewachsene Häsinnen (Gewicht zwischen 3,0 und 4,8 kg), um eine Orientierung über die Normalwerte geschlechtsreifer, nicht tragender Kaninchen zu bekommen. Die mittleren Werte können Tabelle 5 entnommen werden:

KONTROLLE (n = 5)		
	$\bar{x}$	$\pm s_x$
pH	7,20	0,05
$p\text{CO}_2$ (mmHg)	41,6	5,8
$p\text{O}_2$ (mmHg)	118	14

Tabelle 5 - Normalwerte des nicht-tragenden weiblichen Kaninchens (Versuchsserie II)

Im Versuch II/1 (Äther-Sauerstoff, schnelles Anfluten mit hoher Ätherkonzentration, Beatmung über eine Maske) fanden sich 10 Minuten nach Narkosebeginn bei allen Tieren eine mehr oder weniger starke Azidose mit hohen $p\text{CO}_2$ -Werten. Sowohl die pH-Werte, als auch die $p\text{CO}_2$ -Werte, waren gegenüber der Kontrolle signifikant erhöht. Die Azidose wurde während der Narkose zwar teilweise kompensiert, die $p\text{CO}_2$ -Werte zeigten jedoch auch noch 30 Minuten nach Narkosebeginn signifikante Abweichungen im Vergleich zur Kontrolle. Der Sauerstoffpartialdruck war direkt nach Narkosebeginn signifikant erhöht; nach 30 Minuten konnte noch keine vollständige Rückbildung beobachtet werden. Bei allen Tieren wurde während der Narkose eine starke Sekretbildung in den oberen Luftwegen beobachtet, die nur unvollständig abgesaugt werden konnte. Die Ergebnisse sind in Tabelle 6 zusammengefaßt:

VERSUCH II/1 (n = 5)	10 min nach Narkosebeginn		30 min nach Narkosebeginn	
	$\bar{x}$	$\pm s_x$	$\bar{x}$	$\pm s_x$
pH	<u>7,07</u>	0,20	7,19	0,21
$p\text{CO}_2$ (mmHg)	<u>91,4</u>	18,3	<u>91,4</u>	50,7
$p\text{O}_2$ (mmHg)	<u>181</u>	35	<u>148</u>	55

Tabelle 6 - Ergebnisse des Versuches II/1; die Unterschieden der unterstrichenen Werte zur Kontrolle sind signifikant ($p \leq 5\%$).

Im Versuch II/2 (Äther-Preßluft, langsames Anfluten mit steigender Äther-Konzentration, Beatmung über eine Maske) war die Azidose zu Beginn der Narkose im Durchschnitt noch schwerwiegender als im Versuch II/1. Sowohl die pH-Werte, als auch die $p\text{CO}_2$ -Werte waren gegenüber der Kontrolle signifikant verändert. Eine Normalisierung der pH-Werte, 30 Minuten nach Narkosebeginn, wurde begleitet von einem Abfall der zunächst sehr hohen CO_2 -Partialdrucke, die allerdings noch signifikante Unterschiede zur Kontrolle zeigten. Die Sauerstoffpartialdrucke lagen kurz nach Narkosebeginn geringfügig unter den Kontrollwerten; während der Narkose fielen sie noch weiter ab. Die Unterschiede waren in beiden Fällen signifikant. Die Ergebnisse sind in Tabelle 7 zusammengefaßt:

VERSUCH II/2 (n = 5)	10 min nach Narkosebeginn		30 min nach Narkosebeginn	
	$\bar{x}$	$\pm s_x$	$\bar{x}$	$\pm s_x$
pH	<u>6,93</u>	0,21	7,14	0,18
$p\text{CO}_2$ (mmHg)	<u>71,0</u>	22,6	<u>54,6</u>	13,2
$p\text{O}_2$ (mmHg)	<u>98</u>	25	<u>76</u>	25

Tabelle 7 - Ergebnisse des Versuches II/2; die Unterschiede der unterstrichenen Werte zur Kontrolle sind signifikant ($p \leq 5\%$).

Im Versuch II/3 (Äther-Preßluft, schnelles Anfluten mit hoher Äther-Konzentration, Intubation nach Erreichen der Narkosetiefe) konnte zwar zu Beginn der Narkose ein Abfall des mittleren pH-Wertes beobachtet werden, jedoch war dieser Abfall nicht so stark wie im Versuch II/2.

VERSUCH II/3 (n = 5)	10 min nach Narkosebeginn		30 min nach Narkosebeginn	
	$\bar{x}$	$\pm s_x$	$\bar{x}$	$\pm s_x$
pH	7,09	0,19	7,25	0,10
$p\text{CO}_2$ (mmHg)	33,4	10,0	36,2	5,8
$p\text{O}_2$ (mmHg)	118	25	104	17

Tabelle 8 - Ergebnisse des Versuches II/3; die leichten Abweichungen zur Kontrolle sind nicht signifikant

Außerdem fand sich zu den beiden ersten Versuchen kein Anstieg des $p\text{CO}_2$. 30 Minuten nach Narkosebeginn hatten sich die Tiere von ihrer leichten azidotischen Stoffwechsellage wieder erholt. Der pH-Wert lag leicht über dem Kontrollwert, was vermutlich durch Kompensation bedingt war.

Der leichte anfängliche Abfall des CO_2 -Partialdruckes ließ ebenfalls eine Normalisierung erkennen. Die pO_2 -Werte zeigten weder 10, noch 30 Minuten nach Narkosebeginn, starke Abweichungen vom Normalwert. Siehe Zusammenstellung der Ergebnisse in Tabelle 8, Seite 67.

Im Versuch II/4 wurden 10 schwangere Kaninchen mit der im Versuch II/3 beschriebenen Methode untersucht. Die vor der Narkose gewonnenen Werte zeigten eine leichte alkalotische Stoffwechsellaage der tragenden Tiere gegenüber den nicht tragenden Kontrolltiere. Der leicht erniedrigte pCO_2 -Wert deutete hier auf eine mögliche schwangerschaftsbedingte Hyperventilation hin. 30 Minuten nach Narkosebeginn zeigten die Tiere keine groben Abweichungen gegenüber den Untersuchungen vor der Narkose. Man fand lediglich eine größere individuelle Streuung als in der Kontrolle, die in der Standardabweichung der Mittelwerte zum Ausdruck kam. Der pO_2 lag vor und während der Narkose geringfügig unter den Kontrollwerten der nicht tragenden Tiere. Die Ergebnisse sind in Tabelle 9 zusammengefaßt:

VERSUCH II/4 (n = 10)	vor Narkosebeginn		30 min nach Narkosebeginn	
	$\bar{x}$	$\pm s_x$	$\bar{y}$	$\pm s_y$
pH	7,27	0,09	7,27	0,20
pCO_2 (mmHg)	36,5	8,4	40,9	21,1
pO_2 (mmHg)	106	14	104	30

Tabelle 9 - Ergebnisse des Versuches II/4; die leichten Abweichungen zur Kontrolle sind nicht signifikant

Auf den nachfolgenden Abbildungen (20 a - c) sind die Ergebnisse der Versuchsserie II graphisch dargestellt:

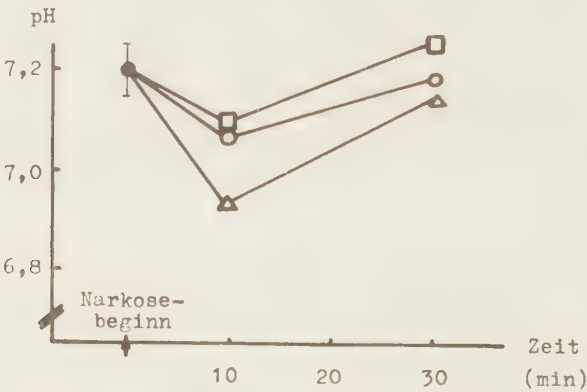


Abbildung 20 a - Ergebnisse der Versuchsserie II - pH-Werte (Erläuterungen siehe Seite 69)

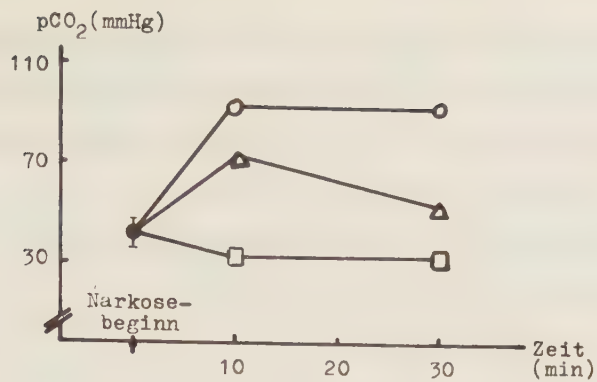


Abbildung 20 b - Ergebnisse der Versuchsserie II - pCO₂-Werte

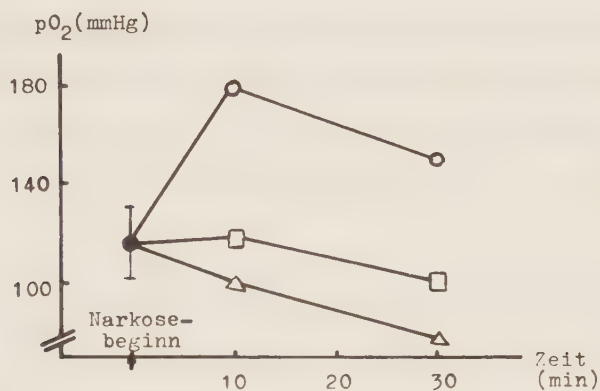


Abbildung 20 c - Ergebnisse der Versuchsserie II - pO₂-Werte

Aus den Abbildungen 20 a - c geht deutlich hervor, daß die mit Versuchsanordnung II/3 (□—□) gewonnenen Werte am geringsten von den Kontrollwerten (I) abweichen; Versuch II/1 (○—○), Versuch II/2 (△—△)

9.4 VERSUCHSSERIE III - Untersuchungen des mütterlichen Blutes und der Dottersackflüssigkeit nach i.v. Applikation von Cyclophosphamid

Die Einzelergebnisse der gesamten Versuchsserie III sind im Tabellenanhang (Seite 139 ff) wiedergegeben. In diesem Abschnitt werden nur die Mittelwerte mit den Standardabweichungen aufgeführt. Außerdem findet sich im Anhang eine Zusammenstellung der Versuchsergebnisse dieser Serie in Form von graphischen Darstellungen (siehe Seite 150 ff).

9.4.1 Versuch III/N - Normalwerte

Die pH- und pCO₂-Werte der schwangeren Muttertiere ließen, ähnlich wie im Versuch II/4 (siehe Versuchsserie II), auf eine alkalotische Stoffwech-

sellage schließen. Diese geringfügige Alkalose war vermutlich respiratorisch bedingt. Eine metabolische Beteiligung ließ sich nicht nachweisen, da die Standardbikarbonatkonzentration nicht bestimmt werden konnte.

(Die zur Verfügung stehenden, empirisch gewonnenen Nomogramme, aus denen die Standardbikarbonatkonzentration bei bekanntem pH und pCO_2 abgelesen wird, wurden für menschliches Blut aufgestellt)

Die Kombination einer respiratorischen und metabolischen Alkalose ist, zumindest beim Menschen (Rick, 1974), außerordentlich selten. Die operationsbedingten Einflüsse waren sehr gering. Die Werte, die vor der Operation gemessen wurden, wichen nur geringfügig von den während der Operation bestimmten Werten ab. Der etwas niedrige pCO_2 von 33,1 mmHg war vermutlich durch eine Hyperventilation zustande gekommen. Die entsprechenden Dottersackwerte unterschieden sich, mit einem pH von 7,05 und einem pCO_2 von 57,6 mmHg, deutlich von den mütterlichen Werten. Die Streuung einzelner pH- und pCO_2 -Werte war in der Dottersackflüssigkeit höher, als bei den Muttertieren selbst.

Der Sauerstoffpartialdruck (pO_2) ergab bei den Muttertieren einen durchschnittlichen Normalwert von 105 mmHg vor der Operation. Während der Operation stieg er auf 123 mmHg an; die individuelle Streuung nahm zu, was sich in einer höheren Standardabweichung zeigte. In der Dottersackflüssigkeit wurde ein mittlerer pO_2 von 115 mmHg gemessen. Der Unterschied zum ersten mütterlichen Wert (Untersuchung vor der Operation) war signifikant ($p = 5\%$), wobei die Streuung der Einzelwerte nahezu gleich blieb. Der während der Operation bestimmte mütterliche Wert lag mit 123 mmHg über dem embryonalen Partialdruck; die Standardabweichung war ebenfalls erhöht. Es konnte nicht entschieden werden, ob der pO_2 der Dottersackflüssigkeit durch operationsbedingte Einflüsse verändert wurde oder nicht.

Die Mittelwerte sind in Tabelle 10 zusammengestellt:

NORMALWERTE (n = 20)	mütterl. Blut vor der Operation		mütterl. Blut währ. der Operation		Dottersack- material währ. der Operation	
	$\bar{x}$	$\pm s_x$	$\bar{x}$	$\pm s_x$	$\bar{x}$	$\pm s_x$
pH	<u>7,26</u>	0,06	<u>7,27</u>	0,12	7,05	0,14
pCO_2 (mmHg)	<u>38,1</u>	7,5	<u>33,1</u>	14,5	57,6	18,4
pO_2 (mmHg)	<u>105</u>	14	123	31	115	15

Tabelle 10 -Normalwerte beim Kaninchen am 9. Tag der Gestation; die unterstrichenen mütterlichen Werte sind gegenüber den Dottersackwerten signifikant unterschiedlich ($p \leq 5\%$).

Die Natrium-Konzentration im mütterlichen Serum (vor und während der Operation) wich nur unwesentlich von den in der Dottersackflüssigkeit gemessenen Werten ab (siehe Tabelle 11).

Dagegen zeigte die Kalium-Konzentration in der Dottersackflüssigkeit mit durchschnittlich 5,5 mval/l gegenüber den mütterlichen Werten signifikante Abweichungen (siehe Tabelle 11). Während der Operation lagen die Kalium-Werte bei den Muttertieren etwas niedriger, als vor der Operation.

Ein ähnliches Verhalten war auch bei den Calcium-Ionen zu finden. Die während der Operation gemessenen Werte lagen niedriger als die Werte, die vor der Operation bestimmt wurden. Die Calcium-Konzentration der Dottersackflüssigkeit war, im Gegensatz zur Kalium-Konzentration, gegenüber den mütterlichen Werten signifikant erniedrigt. Die Standardabweichungen waren jedoch hier, sowohl beim Muttertier, als auch beim Embryo, gleich. Siehe Tabelle 11.

NORMALWERTE (n = 20)	mütterl.Serum vor der Operation		mütterl.Serum währ. der Operation		Dottersack- material währ. der Operation	
	$\bar{x}$	$\pm s_x$	$\bar{x}$	$\pm s_x$	$\bar{x}$	$\pm s_x$
Na ⁺ (mval/l)	137	3	136	4	136	4
K ⁺ (mval/l)	<u>4,7</u>	0,6	<u>3,6</u>	0,4	5,5	0,9
Ca ⁺⁺ (mg/100ml)	<u>14,1</u>	0,8	<u>12,9</u>	0,8	11,0	0,6

Tabelle 11 - Normalwerte beim Kaninchen am 9. Tag der Gestation; die unterstrichenen mütterlichen Werte sind gegenüber den Dottersackwerten signifikant unterschiedlich ($p \leq 5\%$).

Die Gesamteiweißkonzentration zeigte im mütterlichen Serum keine operationsbedingten Abweichungen. Der Eiweißgehalt der Dottersackflüssigkeit lag mit 2,85 g/100 ml unter den im mütterlichen Serum gemessenen Werten. Der Unterschied war signifikant (siehe Tabelle 12).

Die Glukosewerte im mütterlichen Blut stiegen während der Operation von 94 mg/100 ml auf 149 mg/100 ml an, was vermutlich an der sympathomimetischen Wirkung des Äthers lag. Die erhöhte Glukosekonzentration schien sich allerdings nicht auf die Dottersäcke zu übertragen. In der Dottersackflüssigkeit

ergab sich ein durchschnittlicher Glukosewert von 101 mg/100 ml, der von dem mütterlichen Wert (während der Operation) signifikant abwich (siehe Tabelle 12).

Die Lactat-Konzentration änderte sich während der Operation nur geringfügig im Sinne eines leichten Anstieges. Die im Dottersack gemessenen Lactatwerte lagen weit über den mütterlichen Werten. Der Unterschied war signifikant. Die einzelnen Dottersackwerte zeigten drüber hinaus eine größere individuelle Schwankung. Siehe Tabelle 12.

Die Aktivität der alkalischen Phosphatasen stieg während der Operation im mütterlichen Serum leicht an. Die in der Dottersackflüssigkeit bestimmten Aktivitäten lagen bei einer größeren Schwankung der Einzelwerte weit über den mütterlichen Werten (siehe Tabelle 12). Dieser Unterschied war signifikant.

NORMALWERTE (n = 20)	mütterl.Blut/ Serum vor der Operation		mütterl.Blut/ Serum währ.der Operation		Dottersack- material währ. der Operation	
	$\bar{x}$	$\pm s_x$	$\bar{x}$	$\pm s_x$	$\bar{x}$	$\pm s_x$
Gesamteiweiß (g/100ml)	<u>5,2</u>	0,8	<u>5,3</u>	0,8	3,8	0,9
Glucose (mg/100ml)	94	16	<u>149</u>	25	101	23
L-Lactat (mg/100ml)	<u>27</u>	8	<u>35</u>	12	66	30
Alk.Phosphatase (U/l)	<u>22</u>	8	<u>24</u>	8	54	14

Tabelle 12 - Normalwerte beim Kaninchen am 9. Tag der Gestation; die unterstrichenen mütterlichen Werte sind gegenüber den Dottersackwerten signifikant unterschiedlich ($p \leq 5\%$)

Die Konzentrationen der freien Aminosäuren können im Einzelnen Tabelle 13 entnommen werden (siehe Seite 73).

Nahezu alle Aminosäuren (AS) waren im Dottersack höher konzentriert, als im mütterlichen Plasma. Die einzigen Ausnahmen bildeten Taurin, Valin, Cystein und Isoleucin, welche im mütterlichen Plasma höher konzentriert waren. Bei den AS Citrullin, Ethanolamin und Arginin konnten die Unterschiede statistisch nicht nachgeprüft werden, weil Citrullin und Arginin in der Dottersackflüssigkeit und Ethanolamin im mütterlichen Plasma nicht eindeutig

quantitativ bestimmbar waren. Hier konnten lediglich qualitative Nachweise erfolgen. Auffallend war die in der Dottersackflüssigkeit sehr hohen Konzentrationen von Serin, Asparagin und Glutamin (diese AS konnten mit der beschriebenen Methode bei der Ionenaustauschchromatographie nicht voneinander getrennt werden), Glutaminsäure, Glycin und Alanin.

Beim Vergleich der Streuung der Einzelwerte ergab sich kein einheitliches Bild. In der Mehrzahl zeigten jedoch die embryonalen Werte höhere Standardabweichungen, als die mütterlichen Werte.

Die Aminosäurengesamtkonzentration (siehe Tabelle 14) lag in der Dottersackflüssigkeit fast doppelt so hoch wie im mütterlichen Plasma. Dieser Unter-

NORMALWERTE (n = 6) (mg/100ml)	mütterl. Plasma währ. der Operation		Dottersack- material währ. der Operation	
	$\bar{x}$	$\pm s_x$	$\bar{x}$	$\pm s_x$
TAURIN	1,29	0,35	1,00	0,55
ASPARAGIN-SÄURE	0,14	0,04	<u>0,69</u>	0,19
THREONIN	2,11	0,77	<u>4,50</u>	0,59
SERIN	2,73	0,63	<u>8,18</u>	3,20
ASPARAGIN/GLUT.	9,44	5,22	<u>12,49</u>	6,38
PROLIN	4,25	1,24	<u>6,45</u>	1,88
GLUTAMIN-SÄURE	2,80	1,53	<u>9,28</u>	4,38
CITRULLIN	1,36	0,28	(+)	
GLYCIN	9,14	0,31	<u>21,53</u>	7,47
ALANIN	5,52	1,93	<u>24,15</u>	3,94
VALIN	3,81	1,00	3,02	0,60
CYSTEIN	2,66	1,41	2,27	1,60
METHIONIN	0,93	0,46	1,60	0,37
ISOLEUCIN	1,48	0,59	<u>0,96</u>	0,28
LEUCIN	2,31	0,85	2,35	0,36
TYROSIN	1,96	0,62	<u>3,27</u>	0,86
PHENYLALANIN	1,12	0,31	<u>1,87</u>	0,53
ORNITHIN	1,19	0,56	1,30	0,07
ETHANOLAMIN	(+)		0,99	0,11
LYSIN	3,97	1,48	6,27	2,48
HISTIDIN	1,98	0,53	2,25	0,46
ARGININ	3,54	1,53	(+)	

Tabelle 13 - Normalwerte beim Kaninchen am 9. Tag der Gestation; die unterstrichenen Dottersackwerte sind gegenüber den mütterlichen Werten signifikant unterschiedlich ($P \leq 5\%$).

schied war vor allen Dingen auf die sauren und neutralen AS zurückzuführen, da die basischen AS im Dottersack und im mütterlichen Plasma nahezu gleich waren.

Das Konzentrationsgefälle der Aminosäurengesamtkonzentration zwischen Dottersackflüssigkeit und mütterlichem Plasma war signifikant.

NORMALWERTE (n = 6)	mütterl.Plasma währ. der Operation (mg/100ml)	Dottersack- material währ. der Operation (mg/100ml)
Konzentration der sauren und neutralen Aminosäuren	<u>52,0</u> ± 13,4	102,7 ± 19,6
Konzentration der basischen Aminosäuren	10,7 ± 3,8	11,0 ± 2,5
Aminosäuren- Gesamtkonzentration	<u>62,7</u> ± 16,9	113,7 ± 19,4

Tabelle 14 - Normalwerte beim Kaninchen am 9. Tag der Gestation; die unterstrichenen mütterlichen Werte sind gegenüber den Dottersackwerten signifikant unterschiedlich ($p \leq 5\%$).

Es wurde weiterhin der Quotient aus der Konzentration im Dottersack : Konzentration im mütterlichen Blut von allen oben bereits beschriebenen Parametern bestimmt. Dabei ergaben sich folgende Aspekte (siehe Tabelle 15 a/b, Seite 75):

Während Natrium und Calcium keine wesentlichen Konzentrationsgefälle zeigten, war Kalium im Dottersack höher konzentriert, als im mütterlichen Blut. Die Gesamteiweißkonzentration hatte einen Quotienten von 0,6, war also bei der Mutter fast doppelt so hoch konzentriert, wie beim Embryo. Beim Lactat fand man ein umgekehrtes Verhältnis.

Besonders auffällig war der sehr hohe Aktivitätsgradient der alkalischen Phosphatasen (2,3 !).

Nahezu alle AS waren im Dottersack höher konzentriert, als im mütterlichen Plasma. Hervorzuheben sind besonders die Quotienten der AS Asparaginsäure (4,9), Threonin (2,1), Serin (3,0), Glutaminsäure (3,3), Glycin (2,4) und Alanin (4,4).

NORMALWERTE	
$\frac{(\text{Konz.})_{\text{DS}}}{(\text{Konz.})_{\text{M}}}$	
Na ⁺	1,0
K ⁺	1,5
Ca ⁺⁺	0,9
Ges.Eiweiß	0,6
Glucose	0,7
L-Lactat	1,9
AP	2,3

Tab. 15 a (oben)

NORMALWERTE	
$\frac{(\text{Konz.})_{\text{DS}}}{(\text{Konz.})_{\text{M}}}$	
Tau	0,8
Asp	4,9
Thr	2,1
Ser	3,0
Asn/Gln	1,3
Pro	1,5
Glu	3,3
Cit	? (< 1)
Gly	2,4
Ala	4,4
Val	0,8
Cys	0,9
Met	1,7
Ileu	0,6
Leu	1,0
Tyr	1,7
Phe	1,7
Orn	1,1
Eth	? (> 1)
Lys	1,6
His	1,1
Arg	? (< 1)
AS-Ges. Konz.	1,8

Tab. 15 b
(rechts)

Tabelle 15 - Normalwerte beim Kaninchen am 9. Tag der Gestation -
(a/b)

Die Tabellen zeigen die Konzentrationsquotienten der einzelnen Parameter zwischen Embryo und Muttertier.

9.4.2 Untersuchungen nach Gabe von Cyclophosphamid und physiologischer NaCl-Lösung

9.4.2.1 Versuch III/CP₁ und III/NaCl₁ - 1 Stunde nach Applikation

Die mütterlichen pH-Werte waren gegenüber der Kontrolle nur geringfügig erhöht. Die mit CP behandelten Tiere zeigten unter der operationsbedingten Belastung eine größere Labilität im Säure-Basenhaushalt. Dies äußerte sich in einer erhöhten individuellen Streuung, die in der Standardabweichung zum

Ausdruck kam. Der pCO_2 wich vor der Operation vom Kontrollwert signifikant ab, normalisierte sich aber während des Operationsverlaufes.

Die mittleren Dottersackwerte (pH , pCO_2 und pO_2) zeigten alle signifikante Abweichungen gegenüber der Kontrolle. Die pO_2 -Werte lagen wie die mütterlichen Werte (während der Operation) zwar ebenso höher, als in der Kontrolle, eine Korrelation konnte jedoch zwischen Mutter und Embryo nicht nachgewiesen werden (siehe auch die Zusammenstellung der Einzelwerte im Tabellenanhang). Die Ergebnisse sind in Tabelle 16 zusammengefaßt:

1 STUNDE NACH INJEKTION (n = 6)		mütterl. Blut vor der Operation		mütterl. Blut währ. der Operation		Dottersack- material währ. der Operation	
		$\bar{x}$	$\pm s_x$	$\bar{x}$	$\pm s_x$	$\bar{x}$	$\pm s_x$
pH	physiol.NaCl (Kontrolle)	7,23	0,03	7,20	0,09	6,99	0,11
	Cyclophosphamid + physiol.NaCl	7,26	0,03	7,26	0,17	<u>7,10</u>	<u>0,04</u>
pCO_2 (mmHg)	physiol.NaCl (Kontrolle)	39,3	5,2	31,8	6,0	77,1	18,1
	Cyclophosphamid + physiol.NaCl	<u>55,9</u>	13,8	28,9	6,8	<u>98,0</u>	21,1
pO_2 (mmHg)	physiol.NaCl (Kontrolle)	106	15	114	14	114	8
	Cyclophosphamid + physiol.NaCl	108	15	137	28	<u>125</u>	7

Tabelle 16 - Versuch III/CP₁ und III/NaCl₁; Zusammenstellung der Mittelwerte nach Applikation von Cyclophosphamid, bzw. physiologischer NaCl (Kontrolle) - die unterstrichenen Werte sind gegenüber der Kontrolle signifikant unterschiedlich ($p \leq 5\%$).

Die Konzentration der Elektrolyte Natrium, Kalium und Calcium zeigten gegenüber den Kontrollwerten, weder beim Muttertier, noch beim Embryo, signifikante Abweichungen. (siehe Tabelle 17, Seite 77).

Die im Dottersack bestimmten Kalium-Werte lagen über, die Calcium-Werte unter den mütterlichen Werten. Dieses Konzentrationsgefälle zeigte sich schon im Versuch III/N (Normalwerte). Die Streuung der einzelnen Kalium-Werte war in der Dottersackflüssigkeit nach Applikation von CP allerdings signifikant erhöht.

1 STUNDE NACH INJEKTION (n = 6)		mütterl.Serum vor der Operation		mütterl.Serum währ. der Operation		Dottersack- material währ. der Operation	
		$\bar{x}$	$\pm s_x$	$\bar{x}$	$\pm s_x$	$\bar{x}$	$\pm s_x$
Na ⁺ (mval/l)	physiol.NaCl (Kontrolle)	137	3	137	2	135	7
	Cyclophosphamid + physiol.NaCl	135	4	139	4	132	5
K ⁺ (mval/l)	physiol.NaCl (Kontrolle)	4,0	0,3	3,9	0,5	5,0	0,4
	Cyclophosphamid + physiol.NaCl	4,3	0,2	3,8	0,5	5,4	<u>0,9</u>
Ca ⁺⁺ (mg/100ml)	physiol.NaCl (Kontrolle)	13,4	0,4	13,0	0,4	10,9	0,6
	Cyclophosphamid + physiol.NaCl	12,6	1,2	12,5	0,9	10,7	0,6

Tabelle 17 - Versuch III/CP₁ und III/NaCl₁; Zusammenstellung der Mittelwerte nach Applikation von Cyclophosphamid, bzw. physiologischer NaCl (Kontrolle) - der unterstrichene Wert ist gegenüber der Kontrolle signifikant unterschiedlich ($p \leq 5\%$).

Bei der Gesamteiweißkonzentration wurde 1 Stunde nach Applikation von CP, weder bei den Mittelwerten, noch bei den Standardabweichungen, eine wesentliche Änderung gegenüber der Kontrolle gefunden (siehe Tabelle 18, Seite 78). Die Eiweißkonzentration der Dottersackflüssigkeit lag wie im Versuch III/N (Normalwerte), sowohl nach CP-Applikation, als auch im Kontrollversuch, weit unter den mütterlichen Werten.

Die Konzentration der Glukose war sowohl bei der Mutter, als auch beim Embryo, gegenüber der Kontrolle erhöht. Die Unterschiede waren jedoch nicht signifikant. Die individuelle Streuung ließ ebenfalls keinen signifikanten Unterschied erkennen (siehe Tabelle 18, Seite 78).

Die mütterlichen Lactat-Konzentrationen zeigten nach CP-Applikation gegenüber der Kontrolle (vor und während der Operation) keine wesentlichen Abweichungen.

Dagegen fand sich bei den behandelten Tieren ein signifikanter Abfall der Lactat-Konzentration in der Dottersackflüssigkeit. Die Streuung der einzelnen Werte war sowohl im mütterlichen Blut, als auch in der Dottersackflüssigkeit

keit nahezu gleich.

Bei den Aktivitäten der alkalischen Phosphatasen konnten weder im mütterlichen Serum, noch in der Dottersackflüssigkeit, signifikante Unterschiede gefunden werden. Die unterschiedlichen Mittelwerte beim Embryo mußten auf die hohe Streuung der Einzelwerte zurückgeführt werden. Bei zwei Tieren wurden Werte über 100 U/l gemessen (siehe Tabellenanhang), die jedoch nach statistischer Überprüfung mit Hilfe des Rangsummentestes keine Signifikanz bei dem Mittelwert verursachten. Die Standardabweichung ergab in diesem Fall eine signifikante Abweichung. Die Mittelwerte sind in Tabelle 18 zusammengestellt:

1 STUNDE NACH INJEKTION (n = 6)		mütterl.Blut/ Serum vor der Operation		mütterl.Blut/ Serum währ. d. Operation		Dottersack- material währ. der Operation	
		$\bar{x}$	$\pm s_x$	$\bar{x}$	$\pm s_x$	$\bar{x}$	$\pm s_x$
Gesamteiweiß (g/100ml)	physiol.NaCl (Kontrolle)	5,1	0,5	5,0	0,2	3,5	0,5
	Cyclophosphamid + physiol.NaCl	5,3	0,5	5,3	0,6	3,5	0,4
Glucose (mg/100ml)	physiol.NaCl (Kontrolle)	83	18	140	18	97	23
	Cyclophosphamid + physiol.NaCl	104	28	170	39	128	35
L-Lactat (mg/100ml)	physiol.NaCl (Kontrolle)	26	8	42	8	50	3
	Cyclophosphamid + physiol.NaCl	18	4	39	11	45	3
Alk.Phosphat. (U/l)	physiol.NaCl (Kontrolle)	24	13	25	13	41	12
	Cyclophosphamid + physiol.NaCl	28	12	27	9	64	<u>57</u>

Tabelle 18 - Versuch III/CP₁ und III/NaCl₁; Zusammenstellung der Mittelwerte nach Applikation von Cyclophosphamid, bzw. physiologischer NaCl (Kontrolle) - der unterstrichene Wert ist gegenüber der Kontrolle signifikant unterschiedlich ($p \leq 5\%$).

Die Mittelwerte der Aminosäurekonzentrationen zeigten 1 Stunde nach Applikation von CP keine signifikanten Unterschiede zur Kontrolle (siehe Tabelle 19). Dies galt sowohl für das mütterliche Plasma, als auch für die Dottersackflüssigkeit. Es zeigten sich aber, bedingt durch das Auftreten einzelner, stark vom Mittelwert abweichender Einzelwerte, bei einigen AS eine veränderte individuelle Streuung zwischen Versuch (CP-Applikation) und Kontrolle (NaCl-Applikation).

1 STUNDE NACH INJEKTION (n = 5) (mg/100ml)	mütterl. Plasma währ. der Operation				Dottersackmaterial währ. der Operation			
	phys. NaCl (Kontrolle)		CP + phys. NaCl		phys. NaCl (Kontrolle)		CP + phys. NaCl	
	$\bar{x}$	$\pm s_x$	$\bar{x}$	$\pm s_x$	$\bar{x}$	$\pm s_x$	$\bar{x}$	$\pm s_x$
TAURIN	1,17	0,25	1,15	0,38	0,89	0,31	0,70	0,23
ASPARAGIN-SAURE	0,24	0,11	0,15	0,10	0,49	0,17	0,83	<u>0,46</u>
THREONIN	3,07	1,86	1,53	<u>0,49</u>	3,24	0,86	2,88	0,77
SERIN	3,30	1,46	2,21	0,81	5,47	1,78	5,51	1,54
ASPARAGIN/GLUTAMIN	7,94	3,17	6,35	2,14	6,20	1,21	6,30	1,09
PROLIN	3,66	2,09	2,40	<u>0,58</u>	5,03	1,13	5,12	1,36
GLUTAMIN-SAURE	5,76	1,88	4,04	1,36	9,36	3,36	9,59	3,82
CITRULLIN	1,40	0,41	1,78	0,72	(+)	-	(+)	-
GLYCIN	8,43	2,60	8,10	2,42	16,03	3,67	17,08	2,77
ALANIN	5,67	1,48	4,31	1,39	17,22	2,62	19,16	3,17
VALIN	3,41	1,03	2,81	0,84	2,24	0,79	1,49	0,35
CYSTEIN	1,45	0,35	1,01	0,49	1,11	0,60	0,86	0,22
METHIONIN	0,98	0,48	0,75	0,20	1,06	0,44	0,94	0,26
ISOLEUCIN	1,51	0,35	1,41	0,48	0,65	0,39	0,34	<u>0,11</u>
LEUCIN	2,39	0,99	2,12	0,64	2,08	1,78	1,12	<u>0,37</u>
TYROSIN	1,46	0,49	1,60	0,61	1,66	0,43	1,44	<u>0,05</u>
PHENYLALANIN	1,18	0,37	1,07	0,30	1,07	0,41	0,81	0,21
ORNITHIN	1,05	0,34	1,08	0,52	0,70	0,13	0,81	0,30
ETHANOLAMIN	(+)	-	(+)	-	0,65	0,29	0,82	0,29
LYSIN	3,88	0,72	3,49	1,17	4,00	1,03	4,07	0,36
HISTIDIN	2,53	0,60	2,13	0,86	1,78	0,37	1,97	0,54
ARGININ	3,93	1,23	3,22	1,46	(?)	-	(?)	-

Tabelle 19 - Versuch III/CP₁ und III/NaCl₁; Zusammenstellung der Mittelwerte nach Applikation von Cyclophosphamid, bzw. physiologischer NaCl (Kontrolle) - die Unterschiede der unterstrichenen Werte zur Kontrolle sind signifikant (p 5%); () = nur qualitativer Nachweis

Im mütterlichen Plasma fand man beim Threonin und Prolin starke Einzelabweichungen. In der Dottersackflüssigkeit wurden solche Streuungen beim Isoleucin, Leucin, Tyrosin und bei der Asparaginsäure beobachtet. Wegen der

geringen Konzentration war Ethanolamin bei der Mutter und Citrullin beim Embryo nur qualitativ nachweisbar. Arginin konnte im Dottersack nicht einwandfrei nachgewiesen werden. Eventuell vorhandene Spuren konnten durch Verunreinigungen verursacht worden sein.

Die Aminosäuregesamtkonzentration zeigte im mütterlichen Plasma nach CP-Applikation niedrigere, in der Dottersackflüssigkeit leicht erhöhte Werte im Vergleich zur Kontrolle (siehe Tabelle 20). Die Unterschiede waren jedoch nicht signifikant. Bei der Berechnung der prozentualen Abweichung der Aminosäuregesamtkonzentration vom Kontrollwert zeigte sich, daß im mütterlichen Plasma die sauren und neutralen, im Dottersack die basischen AS größere Unterschiede aufwiesen. (siehe Tabelle 21). Dabei fielen die basischen AS nicht so stark ins Gewicht, da sie beim Muttertier nur etwa 1/5, in der Dottersackflüssigkeit nur 1/10 der AS-Gesamtkonzentration ausmachten.

1 STUNDE NACH INJEKTION (n = 5) (mg/100ml)	mütterl. Plasma währ. der Operation				Dottersackmaterial währ. der Operation			
	phys. NaCl (Kontrolle)		CP + phys. NaCl		phys. NaCl (Kontrolle)		CP + phys. NaCl	
	$\bar{x}$	$\pm s_x$	$\bar{x}$	$\pm s_x$	$\bar{x}$	$\pm s_x$	$\bar{x}$	$\pm s_x$
Saure und neutrale Aminosäuren	53,2	15,7	43,0	12,1	73,8	16,7	74,7	12,4
Basische Aminosäuren	11,4	2,6	9,9	3,8	7,1	1,5	7,7	1,1
Aminosäure-Gesamt- konzentration	64,6	11,4	52,9	14,7	80,9	18,1	82,4	12,1

Tabelle 20

Versuch III/CP₁ und III/NaCl₁; Aminosäuregesamtkonzentrationen nach Applikation von CP, bzw. physiologischer NaCl.
(In Tab. 20 sind die Mittelwerte angegeben; Tab. 21 zeigt die prozentuale Abweichung vom jeweiligen Kontrollwert)

1 STUNDE NACH INJEKTION	mütterl. Plasma	Dottersackmaterial
Saure und neutrale Aminosäuren	- 19 %	+ 1 %
Basische Aminosäuren	- 13 %	+ 8 %
Aminosäure-Gesamt- konzentration	- 18 %	+ 2 %

Tabelle 21

Die Konzentrationsgradienten der gemessenen Parameter zwischen mütterlichem Blut und embryonaler Dottersackflüssigkeit wurden aus den Quotienten (Konzentration im Dottersack : Konzentration im mütterlichen Blut) bestimmt.

Dabei fiel besonders, das durch CP verursachte, höhere Konzentrationsgefälle bei den alkalischen Phosphatasen auf. Bei den übrigen Werten (Aminosäuren siehe unten) fanden sich keine auffälligen Verschiebungen (siehe Tabelle 22 a). Alle Parameter zeigten eine recht gute Übereinstimmung

1 STUNDE NACH INJEKTION	$\frac{(\text{Konz.})_{\text{DS}}}{(\text{Konz.})_{\text{M}}}$	
	phys. NaCl (Kontrolle)	CP + phys. NaCl
Na ⁺	1,0	0,9
K ⁺	1,3	1,4
Ca ⁺⁺	0,8	0,9
Ges. Eiweiß	0,7	0,7
Glucose	0,7	0,8
L-Lactat	1,2	1,2
AP	1,6	2,4

Tab. 22 a (oben)

1 STUNDE NACH INJEKTION	$\frac{(\text{Konz.})_{\text{DS}}}{(\text{Konz.})_{\text{M}}}$	
	phys. NaCl (Kontrolle)	CP + phys. NaCl
AS		
Tau	0,8	0,6
Asp	2,0	5,5
Thr	1,1	1,9
Ser	1,7	2,5
Asn/Gln	0,8	1,0
Pro	1,4	2,1
Glu	1,6	2,4
Cit	?	?
Gly	1,9	2,1
Ala	3,3	4,5
Val	0,7	0,5
Cys	0,8	0,9
Met	1,1	1,3
Ileu	0,4	0,2
Leu	0,9	0,5
Tyr	1,1	0,9
Phe	0,9	0,8
Orn	0,7	0,8
Eth	?	?
Lys	1,0	1,2
His	0,7	0,9
Arg	?	?
AS-Ges. Konz.	1,3	1,6

Tab. 22 b
(rechts)

Tabellen 22 a/b - Versuch III/CP₁ und III/NaCl₁; Konzentrationsquotienten zwischen Dottersackflüssigkeit und mütterlichem Blut nach Applikation von CP, bzw. physiologischer NaCl

mit den in Versuch III/N (Normalwerte) gewonnenen Ergebnissen. Das Konzentrationsgefälle der freien AS war nach Applikation von CP entweder nahezu unverändert, oder es verschob sich zugunsten der Dottersackkonzentration (= Erhöhung des Quotienten; siehe auch Tabelle 22 b). Ein, allerdings sehr geringer Abfall, konnte nur bei einigen AS (Tau, Val, Ileu, Leu, Tyr und Phe) beobachtet werden. Auffälliger waren die Verschiebungen bei den AS

Asparagin, Threonin, Serin, Prolin, Glutaminsäure und Alanin. Bei diesen AS stieg der Konzentrationsquotient (Embryo : Muttertier) nach CP-Gabe an.

Auch das Verhältnis der Aminosäuregesamtkonzentration zwischen Keimanlage und Muttertier stieg gegenüber der Kontrolle leicht an.

9.4.2.2 Versuch III/CP₃ und III/NaCl₃ - 3 Stunden nach Applikation

Drei Stunden nach Applikation von CP fand sich beim Muttertier (während der Operation) ein Abfall des mittleren pH-Wertes sowie ein Anstieg des Sauerstoffpartialdruckes. In beiden Fällen war die Abweichung signifikant.

Die entsprechenden Dottersackwerte deuteten nicht auf einen Zusammenhang mit der mütterlichen Stoffwechsellage hin. Während der pH leicht erhöht und der pO₂ leicht erniedrigt waren, zeigte der pCO₂ einen signifikanten Abfall gegenüber der Kontrolle. Die Dottersackwerte wiesen somit im Vergleich zum Muttertier ein genau entgegengesetztes Verhalten auf, was zum Beispiel im Versuch III/CP₁ (1 Stunde nach CP-Gabe) nicht beobachtet werden konnte. Der hohe mittlere pCO₂-Wert bei der Dottersackkontrolle war durch eine große Streuung der Einzelwerte bedingt; der kleinste Wert lag bei 71,0 mmHg, der höchste Wert bei 174,8 mmHg. Die Mittelwerte sind in Tabelle 23, Seite 83 aufgeführt.

Die Ergebnisse der Natrium, Kalium und Calcium Bestimmungen sind in Tabelle 24, Seite 83 zusammengefaßt.

Die Natrium-Konzentration lag nach Applikation von CP bei der Mutter und beim Embryo höher, als in der Kontrolle. Die Unterschiede waren jedoch nicht signifikant. Beim Kalium und beim Calcium fanden sich im mütterlichen Serum, sowohl vor, als auch während der Operation, verringerte Werte gegenüber der Kontrolle. Die Ergebnisse waren jedoch nur vor der Operation signifikant. Während die Kalium-Konzentration in der Dottersackflüssigkeit nach CP-Gabe über dem Kontrollwert lag, zeigte die Calcium-Konzentration eine Verringerung. Beim Natrium und beim Calcium konnten keine größeren Schwankungen der Einzelwerte beobachtet werden. Dagegen zeigten alle Standardabweichungen der mittleren Kalium-Werte signifikante Abweichungen gegenüber den Kontrollen.

3 STUNDEN NACH INJEKTION (n = 6)		mütterl. Blut vor der Operation		mütterl. Blut währ. der Operation		Dottersack- material währ. der Operation	
		$\bar{x}$	$\pm s_x$	$\bar{x}$	$\pm s_x$	$\bar{x}$	$\pm s_x$
pH	physiol.NaCl (Kontrolle)	7,25	0,07	7,22	0,08	6,87	0,14
	Cyclophosphamid + physiol.NaCl	7,25	0,02	<u>7,06</u>	0,10	6,99	0,11
pCO ₂ (mmHg)	physiol.NaCl (Kontrolle)	41,9	8,3	30,7	4,4	124,8	37,1
	Cyclophosphamid + physiol.NaCl	43,9	10,8	34,0	7,3	<u>70,5</u>	18,3
pO ₂ (mmHg)	physiol.NaCl (Kontrolle)	106	10	114	27	114	9
	Cyclophosphamid + physiol.NaCl	112	10	<u>155</u>	31	110	12

Tabelle 23

3 STUNDEN NACH INJEKTION (n = 6)		mütterl.Serum vor der Operation		mütterl.Serum währ. der Operation		Dottersack- material währ. der Operation	
		$\bar{x}$	$\pm s_x$	$\bar{x}$	$\pm s_x$	$\bar{x}$	$\pm s$
Na ⁺ (mval/l)	physiol.NaCl (Kontrolle)	135	6	137	4	133	3
	Cyclophosphamid + physiol.NaCl	139	5	139	3	136	4
K ⁺ (mval/l)	physiol.NaCl (Kontrolle)	4,3	0,4	4,0	0,7	5,3	0,5
	Cyclophosphamid + physiol.NaCl	<u>3,8</u>	<u>0,1</u>	3,4	<u>0,2</u>	5,9	<u>1,3</u>
Ca ⁺⁺ (mg/100ml)	physiol.NaCl (Kontrolle)	13,7	0,4	13,2	0,7	11,2	0,9
	Cyclophosphamid + physiol.NaCl	<u>12,8</u>	0,5	12,5	0,6	10,1	1,2

Tabelle 24

Tabellen 23/24 - Versuch III/CP₃ und III/NaCl₃; Zusammenstellung der Mittelwerte nach Applikation von CP₃ bzw. physiologischer NaCl (Kontrolle) - die unterstrichenen Werte sind gegenüber der Kontrolle signifikant unterschiedlich ($p \leq 5\%$).

Die Gesamteiweißkonzentration im mütterlichen Serum und in der Dottersackflüssigkeit lag 3 Stunden nach CP-Gabe unter den Kontrollwerten. Die Abweichungen waren nicht signifikant (siehe Tabelle 25).

Die Glukose-Werte unterschieden sich ebenfalls nur unwesentlich voneinander (Vergleich zwischen Kontrolle und Versuch). Ein operationsbedingter Anstieg der mütterlichen Glukosewerte wurde auch schon in den vorangegangenen Versuchen (III/N, III/CP₁ und III/NaCl₁) beobachtet. Der während der Operation gemessene Glukosewert in der Dottersackflüssigkeit stieg nicht an (siehe Tabelle 25).

3 STUNDEN NACH INJEKTION (n = 6)		mütterl.Blut/ Serum vor der Operation		mütterl.Blut/ Serum währ.d. Operation		Dottersack- material währ. der Operation	
		$\bar{x}$	$\pm s_x$	$\bar{x}$	$\pm s_x$	$\bar{x}$	$\pm s_x$
Gesamteiweiß (g/100ml)	physiol.NaCl (Kontrolle)	5,9	0,6	5,4	0,5	3,9	0,9
	Cyclophosphamid + physiol.NaCl	5,1	0,6	5,4	0,8	3,8	0,7
Glucose (mg/100ml)	physiol.NaCl (Kontrolle)	85	19	144	34	93	19
	Cyclophosphamid + physiol.NaCl	83	24	142	32	93	12
L-Lactat (mg/100ml)	physiol.NaCl (Kontrolle)	30	12	44	10	49	7
	Cyclophosphamid + physiol.NaCl	27	13	51	15	53	<u>19</u>
Alk.Phosphat. (U/l)	physiol.NaCl (Kontrolle)	22	10	27	12	42	26
	Cyclophosphamid + physiol.NaCl	21	9	19	7	41	21

Tabelle 25 - Versuch III/CP₃ und III/NaCl₃; Zusammenstellung der Mittelwerte nach Applikation von CP₃ bzw. physiologischer NaCl (Kontrolle) - der unterstrichene Wert ist gegenüber der Kontrolle signifikant unterschiedlich ($p \leq 5\%$).

Die mittleren Lactat-Konzentrationen ergaben nach CP-Applikation keine signifikanten Unterschiede gegenüber den Kontrollwerten. Bei den Muttertieren konnte ein leichter, operationsbedingter Anstieg beobachtet werden, der vermutlich durch CP verstärkt wurde. Nahezu gleiche Werte, in Versuch und

Kontrolle, ergaben die Messungen in der Dottersackflüssigkeit. Die Ergebnisse sind in Tabelle 25, Seite 84, zusammengefaßt.

Bei der Aktivität der alkalischen Phosphatasen konnte außer einem geringen operationsbedingten Abfall beim Muttertier keine Veränderungen festgestellt werden (siehe Tabelle 25, Seite 84).

Die Mittelwerte der einzelnen Aminosäuren (siehe Tabelle 26) zeigten 3 Stunden nach CP-Gabe einige signifikante Abweichungen gegenüber den Kontrollwerten.

3 STUNDEN NACH INJEKTION (n = 5) (bei *) n = 4) (mg/100ml)	mütterl. Plasma währ. der Operation				Dottersackmaterial währ. der Operation			
	phys. NaCl (Kontrolle)		CP + phys. NaCl		phys. NaCl (Kontrolle)		CP + phys. NaCl	
	$\bar{x}$	$\pm s_x$	$\bar{x}$	$\pm s_x$	$\bar{x}$	$\pm s_x$	$\bar{x}$	$\pm s_x$
TAURIN	1,56	1,36	1,68	1,08	0,75	0,30	0,62	0,41
ASPARAGIN-SÄURE	0,24	0,09	0,15	0,09	0,59	0,25	0,81	<u>0,72</u>
THREONIN	2,37	0,24	1,54	0,56	2,81	1,31	2,32	0,81
SERIN	3,63	0,77	<u>2,37</u>	0,92	5,40	1,95	5,62	2,10
ASPARAGIN/GLUTAMIN	8,68	0,62	<u>5,95</u>	1,33	6,47	3,85	5,14	1,88
PROLIN	3,91	0,78	2,95	0,88	5,11	1,15	4,46	1,96
GLUTAMIN-SÄURE	6,23	1,01	4,63	2,16	9,48	3,70	8,45	4,14
CITRULLIN	1,57	0,51	1,34	0,45	(+)	-	(+)	-
GLYCIN	11,91	2,37	<u>7,73</u>	3,58	17,31	7,04	16,71	5,38
ALANIN	6,99	0,83	<u>4,78</u>	1,63	19,40	8,56	15,35	5,68
VALIN	3,75	0,50	3,02	1,07	2,13	1,18	1,53	<u>0,38</u>
CYSTEIN	1,31	0,53	1,30 ^{*)}	0,35	0,93	0,34	1,07	0,41
METHIONIN	1,03	0,37	0,78	0,29	0,83	0,40	1,03	0,51
ISOLEUCIN	1,58	0,35	1,41	0,62	0,82 ^{*)}	0,65	0,82	0,79
LEUCIN	2,54	0,37	2,25	0,84	1,71	1,02	1,17	0,41
TYROSIN	1,80	0,40	1,33	0,39	2,03	1,14	2,01	0,68
PHENYLALANIN	1,09	0,21	0,97	0,31	1,01	0,65	1,24	0,46
ORNITHIN	1,22	0,29	1,25	0,68	0,70	0,17	0,84	0,23
ETHANOLAMIN	(+)	-	(+)	-	0,51	0,19	0,66	0,14
LYSIN	4,69	1,67	4,21	2,04	4,60	1,38	3,22	0,78
HISTIDIN	3,00	1,16	<u>1,80</u>	0,99	1,91	0,46	1,85	0,43
ARGININ	4,06	0,34	2,95	0,67	(?)	-	(+?)	-

Tabelle 26 - Versuch III/CP₃ und III/NaCl₃; Zusammenstellung der Mittelwerte nach Applikation von CP, bzw. physiologischer NaCl (Kontrolle) - die Unterschiede der unterstrichenen Werte zur Kontrolle sind signifikant ($p \leq 5\%$).
(+) = nur qualitativer Nachweis

Es fand sich ein Konzentrationsabfall von Glutamin/Asparagin, Glycin, Alanin und Histidin. Die Aminosäurengesamtkonzentration (siehe Tabelle 27,

Seite 86) fiel beim Muttertier um 21% ab und war gegenüber dem Kontrollwert signifikant. Dieser Abfall mußte in erster Linie auf die sauren und neutralen AS zurückgeführt werden, die ebenfalls wesentlich von der Kontrolle abwichen. Eine Verringerung der basischen AS um 26% war zwar absolut gesehen größer, konnte aber statistisch nicht abgesichert werden. Die AS im Dottersack ergaben keine signifikanten Abweichungen. Man fand lediglich eine größere Streuung der Einzelwerte bei der Asparaginsäure und eine geringere beim Valin.

Die Berechnung der AS-Gesamtkonzentration deutete allerdings auch hier auf eine CP-bedingte Verminderung hin.

3 STUNDEN NACH INJEKTION (n = 5) (mg/100ml)	mütterl. Plasma währ. der Operation				Dottersackmaterial währ. der Operation			
	phys. NaCl (Kontrolle)		CP + phys. NaCl		phys. NaCl (Kontrolle)		CP + phys. NaCl	
	$\bar{x}$	$\pm s_x$	$\bar{x}$	$\pm s_x$	$\bar{x}$	$\pm s_x$	$\bar{x}$	$\pm s_x$
Saure und neutrale Aminosäuren	59,8	3,1	<u>47,8</u>	13,9	76,5	30,3	66,4	21,1
Basische Aminosäuren	13,0	3,3	9,6	2,7	7,7	2,0	6,5	1,5
Aminosäure-Gesamt- konzentration	72,8	6,1	<u>57,4</u>	15,4	84,2	31,4	72,9	23,1

Tabelle 27

Versuch III/CP₃ und III/NaCl₃; Aminosäurengesamtkonzentratrati on nach Applikati on von CP, bzw. physiologischer NaCl.
(In Tab. 27 sind die Mittelwerte angegeben; Tab. 28 zeigt die prozentuale Abweichung vom jeweiligen Kontrollwert)

3 STUNDEN NACH INJEKTION	mütterl. Plasma	Dottersackmaterial
Saure und neutrale Aminosäuren	- 20 %	- 13 %
Basische Aminosäuren	- 26 %	- 16 %
Aminosäure-Gesamt- konzentration	- 21 %	- 13 %

Tabelle 28

Die Konzentrationsgefälle der einzelnen gemessenen Parameter zwischen Embryo und Mutter boten, außer bei den AS, nur bei der alkalischen Phosphatasen-Aktivität (siehe Tabelle 29 a, Seite 87) eine CP-bedingte Verschiebung.

Der Quotient von 1,6 (embryonale Konz. : mütterliche Konz.) in der Kontrolle erhöhte sich nach Gabe von CP auf 2,2. Eine solche Veränderung war schon 1 Stunde nach Behandlung mit CP (Versuch III/CP₁) beobachtet worden.

Bei den AS Asparaginsäure, Threonin, Serin, Prolin, Glutaminsäure, Glycin, Alanin, Methionin, Tyrosin und Phenylalanin fand sich ebenfalls ein Anstieg dieses Quotienten gegenüber der Kontrolle. Ein Abfall wurde nur beim Leucin und beim Lysin beobachtet.

Die Quotienten der Aminosäurengesamtkonzentration blieben nach Applikation von CP nahezu gleich.

3 STUNDEN NACH INJEKTION	$\frac{(\text{Konz.})_{\text{DS}}}{(\text{Konz.})_{\text{M}}}$	
Parameter	phys. NaCl (Kontrolle)	CP + phys. NaCl
Na ⁺	1,0	1,0
K ⁺	1,3	1,7
Ca ⁺⁺	0,9	0,8
Ges. Eiweiß	0,7	0,7
Glucose	0,7	0,7
L-Lactat	1,1	1,0
AP	1,6	2,2

Tab. 29 a (oben)

3 STUNDEN NACH INJEKTION	$\frac{(\text{Konz.})_{\text{DS}}}{(\text{Konz.})_{\text{M}}}$	
AS	phys. NaCl (Kontrolle)	CP + phys. NaCl
Tau	0,5	0,4
Asp	2,5	5,4
Thr	1,2	1,5
Ser	1,5	2,4
Asn/Gln	0,8	0,9
Pro	1,3	1,5
Glu	1,5	1,8
Cit	?	?
Gly	1,5	2,2
Ala	2,8	3,2
Val	0,6	0,5
Cys	0,7	0,8
Met	0,8	1,3
Ileu	0,5	0,6
Leu	0,7	0,5
Tyr	1,1	1,5
Phe	0,9	1,3
Orn	0,6	0,7
Eth	?	?
Lys	1,0	0,8
His	0,6	1,0
Arg	?	?
AS-Ges. Konz.	1,2	1,3

Tab. 29 b
(rechts)

Tabellen 29 a/b - Versuch III/CP₃ und III/NaCl₃; Konzentrationsquotienten zwischen Dottersackflüssigkeit und mütterlichem Blut nach Applikation von CP, bzw. physiologischer NaCl

9.4.2.3 Versuch III/CP₆ und III/NaCl₆ - 6 Stunden nach Applikation

Eine Zusammenfassung der pH, pCO₂ und pO₂-Werte findet sich in Tabelle 30. Im Säure-Basen-Haushalt konnten 6 Stunden nach Gabe von CP keine wesentlichen Veränderungen beobachtet werden. Ein leichter operationsbedingter Abfall der pCO₂-Werte wurde, wenn auch nicht so stark, auch in der Kontrolle gefunden. Die individuelle Schwankung der einzelnen pH-Werte war, sowohl beim Muttertier, als auch beim Embryo gegenüber der Kontrolle leicht erhöht. Signifikanz lag nicht vor.

Der O₂-Partialdruck stieg während der Operation, sowohl bei der Mutter, als auch in der Dottersackflüssigkeit, im Vergleich zur Kontrolle an. Die Standardabweichung nahm zu.

6 STUNDEN NACH INJEKTION (n = 6)		mütterl. Blut vor der Operation		mütterl. Blut währ. der Operation		Dottersack- material währ. der Operation	
		$\bar{x}$	$\pm s_x$	$\bar{x}$	$\pm s_x$	$\bar{x}$	$\pm s_x$
pH	physiol.NaCl (Kontrolle)	7,25	0,05	7,26	0,06	7,07	0,11
	Cyclophosphamid + physiol.NaCl	7,23	0,07	7,22	0,11	7,03	0,15
pCO ₂ (mmHg)	physiol.NaCl (Kontrolle)	37,2	7,2	29,0	3,9	57,1	20,1
	Cyclophosphamid + physiol.NaCl	34,5	5,5	24,2	3,4	63,6	18,9
pO ₂ (mmHg)	physiol.NaCl (Kontrolle)	101	11	112	21	105	6
	Cyclophosphamid + physiol.NaCl	111	11	<u>137</u>	34	<u>132</u>	<u>17</u>

Tabelle 30 - Versuch III/CP₆ und III/NaCl₆; Zusammenstellung der Mittelwerte nach Applikation von ⁶CP, bzw. physiologischer NaCl (Kontrolle) - die unterstrichenen Werte sind gegenüber der Kontrolle signifikant unterschiedlich (p ≤ 5%).

Bei den Elektrolytwerten der Muttertiere konnte neben einem leichten Abfall der Natrium- und Calcium-Konzentration eine starke Verminderung des Kalium-Gehaltes beobachtet werden, die gegenüber den Kontrollwerten signifikant war. In der Dottersackflüssigkeit fanden sich starke Veränderungen bei allen gemessenen Elektrolyten, im Sinne einer CP-bedingten Verminderung.

Die Unterschiede waren signifikant. Die Einzelwerte zeigten keine größeren Schwankungen. Eine Zusammenfassung der Mittelwerte findet sich in Tabelle 31:

6 STUNDEN NACH INJEKTION (n = 6)		mütterl.Serum vor der Operation		mütterl.Serum währ. der Operation		Dottersack- material währ. der Operation	
		$\bar{x}$	$\pm s_x$	$\bar{x}$	$\pm s_x$	$\bar{x}$	$\pm s_x$
Na ⁺ (mval/l)	physiol.NaCl (Kontrolle)	138	4	139	3	134	3
	Cyclophosphamid + physiol.NaCl	137	4	137	5	<u>129</u>	5
K ⁺ (mval/l)	physiol.NaCl (Kontrolle)	4,2	0,1	3,6	0,2	5,4	0,6
	Cyclophosphamid + physiol.NaCl	<u>3,8</u>	0,4	<u>3,3</u>	0,3	<u>6,7</u>	1,0
Ca ⁺⁺ (mg/100ml)	physiol.NaCl (Kontrolle)	13,5	0,8	13,0	0,7	11,1	0,8
	Cyclophosphamid + physiol.NaCl	13,2	0,4	12,7	0,6	<u>10,1</u>	0,7

Tabelle 31 - Versuch III/CP₆ und III/NaCl₆; Zusammenstellung der Mittelwerte nach Applikation von CP, bzw. physiologischer NaCl (Kontrolle) - die unterstrichenen Werte sind gegenüber der Kontrolle signifikant unterschiedlich ($p \leq 5\%$).

Die Gesamteiweißkonzentration war beim Muttertier 6 Stunden nach CP-Gabe erhöht. Die Unterschiede zur Kontrolle waren, sowohl vor, als auch während der Operation, signifikant. In der Dottersackflüssigkeit ergab sich allerdings keine Abweichung, die auf CP zurückgeführt werden konnte.

Die Dottersackwerte lagen, wie in den vorangegangenen Versuchen, unter den mütterlichen Werten. Die Standardabweichung war nach Gabe des Medikamentes gegenüber der Kontrolle geringfügig erhöht. Die Mittelwerte sind in Tabelle 32 zusammengestellt.

Bei den Glukosewerten fand sich weder bei der Mutter, noch beim Embryo, eine signifikante Abweichung (siehe Tabelle 32). Ein operationsbedingter Anstieg im mütterlichen Blut, der sich nicht auf die Dottersackflüssigkeit übertrug, war aus den vorangegangenen Versuchen bekannt.

Die mütterlichen Lactat-Konzentrationen zeigten zwar während der Operation einen leichten Anstieg; dieser war allerdings nicht signifikant.

Die Dottersackwerte unterschieden sich nur geringfügig von der Kontrolle (siehe Tabelle 32).

Die Aktivität der alkalischen Phosphatasen stieg 6 Stunden nach CP-Applikation, sowohl beim Muttertier, als auch in der Dottersackflüssigkeit, an, war aber in keinem Fall signifikant. Die Standardabweichung, als Ausdruck für die Schwankung der Einzelwerte, nahm stark zu. Sie war gegenüber der Kontrolle signifikant.

Eine Erhöhung der alkalischen Phosphatasen im Dottersack einzelner Tiere wurde schon im Versuch III/CP₁ (1 Stunde nach CP-Gabe) gefunden.

Eine Aufstellung der Mittelwerte findet sich in Tabelle 32:

6 STUNDEN NACH INJEKTION (n = 6)		mütterl.Blut/ Serum vor der Operation		mütterl.Blut/ Serum währ.d. Operation		Dottersack- material währ. der Operation	
		$\bar{x}$	$\pm s_x$	$\bar{x}$	$\pm s_x$	$\bar{x}$	$\pm s_x$
Gesamteiweiß (g/100ml)	physiol.NaCl (Kontrolle)	5,4	0,4	5,0	0,6	4,3	0,4
	Cyclophosphamid + physiol.NaCl	<u>6,1</u>	0,5	<u>5,8</u>	0,2	4,1	0,7
Glucose (mg/100ml)	physiol.NaCl (Kontrolle)	80	12	145	22	96	16
	Cyclophosphamid + physiol.NaCl	81	21	158	15	90	17
L-Lactat (mg/100ml)	physiol.NaCl (kontrolle)	32	14	44	4	45	6
	Cyclophosphamid + physiol.NaCl	28	12	39	8	41	10
Alk.Phosphat. (U/l)	physiol.NaCl (Kontrolle)	19	3	18	3	36	10
	Cyclophosphamid + physiol.NaCl	21	<u>11</u>	21	<u>11</u>	55	<u>37</u>

Tabelle 32 - Versuch III/CP₆ und III/NaCl₆; Zusammenstellung der Mittelwerte nach Applikation von CP, bzw. physiologischer NaCl (Kontrolle)- die unterstrichenen Werte sind gegenüber der Kontrolle signifikant unterschiedlich ($p \leq 5\%$).

Die freien Aminosäuren ließen 6 Stunden nach Behandlung mit CP vor allem beim Muttertier starke Abweichungen gegenüber der Kontrolle erkennen, die

auch teilweise auf den Embryo übergriffen. Fast alle AS zeigten einen mehr oder weniger starken Abfall, der in vielen Fällen signifikant war (siehe Tabelle 33). Außerdem nahm bei einigen Werten die individuelle Schwankung signifikant zu. Auffällig war weiterhin, daß bei den Muttertieren ein Abfall der Mittelwerte eintrat, während sich im Dottersackmaterial die Schwankungsbreite der einzelnen AS vergrößerte. In den Abbildungen 21 - 28 werden die Chromatogramme eines Kontrolltieres und eines Versuchstieres als Beispiel wiedergegeben (Seite 94 - 97).

6 STUNDEN NACH INJEKTION (n = 5) (mg/100ml)	mütterl. Plasma währ. der Operation				Dottersackmaterial währ. der Operation			
	phys. NaCl (Kontrolle)		CP + phys. NaCl		phys. NaCl (Kontrolle)		CP + phys. NaCl	
	$\bar{x}$	$\pm s_x$	$\bar{x}$	$\pm s_x$	$\bar{x}$	$\pm s_x$	$\bar{x}$	$\pm s_x$
TAURIN	1,36	0,42	1,43	1,01	1,16	0,31	<u>0,63</u>	0,31
ASPARAGIN-SÄURE	0,31	0,10	<u>0,11</u>	0,04	0,72	0,20	0,68	0,42
THREONIN	2,90	1,42	<u>1,26</u>	<u>0,39</u>	3,95	0,82	<u>2,59</u>	0,69
SERIN	2,86	1,14	<u>1,56</u>	<u>0,36</u>	6,92	1,90	<u>4,76</u>	1,29
ASPARAGIN/GLUTAMIN	7,91	3,39	<u>4,63</u>	1,67	7,91	3,26	5,75	1,90
PROLIN	3,94	1,06	<u>2,35</u>	0,87	4,77	1,14	4,56	2,28
GLUTAMIN-SÄURE	7,88	2,23	<u>3,71</u>	2,08	13,91	3,97	10,46	5,28
CITRULLIN	1,52	0,76	0,94	0,71	(+)	-	(+)	-
GLYCIN	12,21	3,77	<u>5,16</u>	1,38	17,86	4,08	14,33	<u>5,36</u>
ALANIN	6,38	1,65	<u>4,12</u>	1,65	21,74	5,26	16,68	5,48
VALIN	4,08	1,65	2,49	0,85	2,19	0,21	1,88	<u>0,59</u>
CYSTEIN	1,05	0,37	1,06	0,16	1,54	0,61	0,85	0,55
METHIONIN	1,26	0,35	1,74	<u>1,69</u>	1,41	0,49	<u>0,67</u>	0,26
ISOLEUCIN	1,63	0,52	<u>1,00</u>	0,49	0,81	0,22	0,58	0,26
LEUCIN	2,94	1,24	1,98	1,05	1,67	0,15	1,53	<u>0,68</u>
TYROSIN	2,23	0,78	<u>1,33</u>	0,59	2,32	0,77	1,65	0,94
PHENYLALANIN	1,67	0,38	<u>0,92</u>	0,44	2,01	0,28	1,14	<u>0,73</u>
ORNITHIN	1,07	0,40	0,76	0,55	0,77	0,17	0,85	0,19
ETHANOLAMIN	(+)	-	(+)	-	0,54	0,22	0,79	0,44
LYSIN	3,73	1,11	4,26	2,05	3,80	0,84	4,39	1,82
HISTIDIN	2,36	0,51	<u>1,67</u>	0,74	2,22	0,32	1,89	0,45
ARGININ	3,03	0,80	3,05	1,39	(?)	-	(?)	-

Tabelle 33 - Versuch III/CP₆ und III/NaCl₆; Zusammenstellung der Mittelwerte nach Applikation von CP₆ bzw. physiologischer NaCl (Kontrolle) - die Unterschiede der unterstrichenen Werte zur Kontrolle sind signifikant ($p \leq 5\%$).
(+) = nur qualitativer Nachweis

Die Aminosäurengesamtkonzentration fiel bei der Mutter um durchschnittlich 37% und beim Embryo um 22% (siehe Tabellen 34 und 35, Seite 92). Die sauren und neutralen AS zeigten, wie auch schon in vorherigen Versuchen, eine stärkere Abweichung, als die basischen AS. Der Abfall im mütterlichen

Plasma war, wie im Versuch III/CP₃ (3 Stunden nach CP-Gabe), signifikant.

6 STUNDEN NACH INJEKTION (n = 5) (mg/100ml)	mütterl.Plasma währ. der Operation				Dottersackmaterial währ. der Operation			
	phys.NaCl (Kontrolle)		CP + phys. NaCl		phys.NaCl (Kontrolle)		CP + phys. NaCl	
	$\bar{x}$	$\pm s_x$	$\bar{x}$	$\pm s_x$	$\bar{x}$	$\pm s_x$	$\bar{x}$	$\pm s_x$
Saure und neutrale Aminosäuren	62,3	17,0	<u>36,0</u>	13,7	91,1	20,1	68,6	25,1
Basische Aminosäuren	10,2	2,7	9,7	4,5	7,1	1,1	7,9	2,6
Aminosäure-Gesamt- konzentration	72,5	19,3	<u>45,7</u>	17,7	98,2	21,2	76,5	25,7

Tabelle 34

Versuch III/CP₆ und III/NaCl₆; Aminosäurengesamtkonzentration nach Applikation von CP, bzw. physiologischer NaCl (Kontrolle) (In Tabelle 34 sind die Mittelwerte angegeben; Tabelle 35 zeigt die prozentuale Abweichung vom jeweiligen Kontrollwert - die unterstrichenen Werte sind gegenüber der Kontrolle signifikant unterschiedlich ($p \leq 5\%$)).

6 STUNDEN NACH INJEKTION	mütterl.Plasma	Dottersackmaterial
Saure und neutrale Aminosäuren	- 42 %	- 25 %
Basische Aminosäuren	- 4 %	+ 11 %
Aminosäure-Gesamt- konzentration	- 37 %	- 22 %

Tabelle 35

Die Berechnung der Konzentrationsquotienten (Embryo : Mutter) ergaben eine CP-bedingte Erhöhung des Quotienten für das Kalium und die Aktivität der alkalischen Phosphatasen. Die Vergrößerung des Kalium-Gefälles zwischen Embryo und Mutter wurde in den vorangegangenen Versuchen nur andeutungsweise beobachtet. Bei den alkalischen Phosphatasen war dieser Anstieg bereits bekannt.

Bei den AS waren bis auf Q_{Tau} , Q_{Met} und Q_{Lys} alle Quotienten gegenüber der Kontrolle erhöht, was durch eine verstärkte Abnahme der freien AS im mütterlichen Plasma zustande kam. Der Quotient der AS-Gesamtkonzentration war nur

leicht erhöht. Die hier aufgetretenen Veränderungen im Aminosäurestoffwechsel konnten in diesem Maße nach 1 und nach 3 Stunden nicht beobachtet werden.

6 STUNDEN NACH INJEKTION	$\frac{(\text{Konz.})_{\text{DS}}}{(\text{Konz.})_{\text{M}}}$	
	phys. NaCl (Kontrolle)	CP + phys. NaCl
Na ⁺	1,0	0,9
K ⁺	1,5	2,0
Ca ⁺⁺	0,9	0,8
Ges. Eiweiß	0,9	0,7
Glucose	0,7	0,6
L-Lactat	1,0	1,1
AP	2,0	2,6

Tab. 36 a (oben)

6 STUNDEN NACH INJEKTION	$\frac{(\text{Konz.})_{\text{DS}}}{(\text{Konz.})_{\text{M}}}$	
	phys. NaCl (Kontrolle)	CP + phys. NaCl
AS		
Tau	0,9	0,4
Asp	2,3	6,2
Thr	1,4	2,1
Ser	2,4	3,1
Asn/Gln	1,0	1,2
Pro	1,2	1,9
Glu	1,8	2,8
Cit	?	?
Gly	1,5	2,8
Ala	3,4	4,1
Val	0,5	0,8
Cys	1,5	0,8
Met	1,1	0,4
Ileu	0,5	0,6
Leu	0,6	0,8
Tyr	1,0	1,2
Phe	1,2	1,2
Orn	0,7	1,1
Eth	?	?
Lys	1,0	1,0
His	0,9	1,1
Arg	?	?
AS-Ges. Konz.	1,4	1,7

Tab. 36 b
(rechts)

Tabellen 36 a/b - Versuch III/CP₆ und III/NaCl₆; Konzentrationsquotienten zwischen Dottersackflüssigkeit und mütterlichem Blut nach Applikation von CP, bzw. physiologischer NaCl (Kontrolle)

9.4.2.4 Versuch III/CP₁₂ und III/NaCl₁₂ - 12 Stunden nach Applikation

Die pH-, pCO₂- und pO₂- Mittelwerte sind in Tabelle 39, Seite 98, aufgeführt.

12 Stunden nach Applikation von CP zeigten die Muttertiere bei einem leicht erhöhtem pCO₂ einen, gegenüber der Kontrolle signifikanten, Abfall des pH-Wertes (vor der Operation). Wegen der fehlenden Standardbikarbonat-Konzen-

(Fortsetzung Seite 98)

BECKMAN-MULTICHROM	
SÄULE Länge	M-72 55 cm 0,9 cm
DURCHFLUSSRATE PUFFER NINHYDRIN	50 ml/h 25 ml/h
PUFFER A 3,25, 0,2n B 4,25, 0,2n	170 min 110 min
TEMPERATUR A B	30°C 55°C
RECORDER VORSCHUB	PHILIPS - PR 35 150 mm/h
regeneriert mit 0,4n NaOH (30 min) öquilibriert mit Puffer-A	

Tabelle 37 -

Programm zur Trennung der sauren und neutralen AS im mütterlichen Blut (siehe Abb. 21 und 22) und in der Dottersackflüssigkeit 9 Tage alter Kaninchenembryonen (siehe Abb. 23 und 24, Seite 95).

Abb. 21 (unten) - freie AS im mütterlichen Blut (9.d.p.c.) nach Applikation von physiologischer NaCl (Kontrolle)

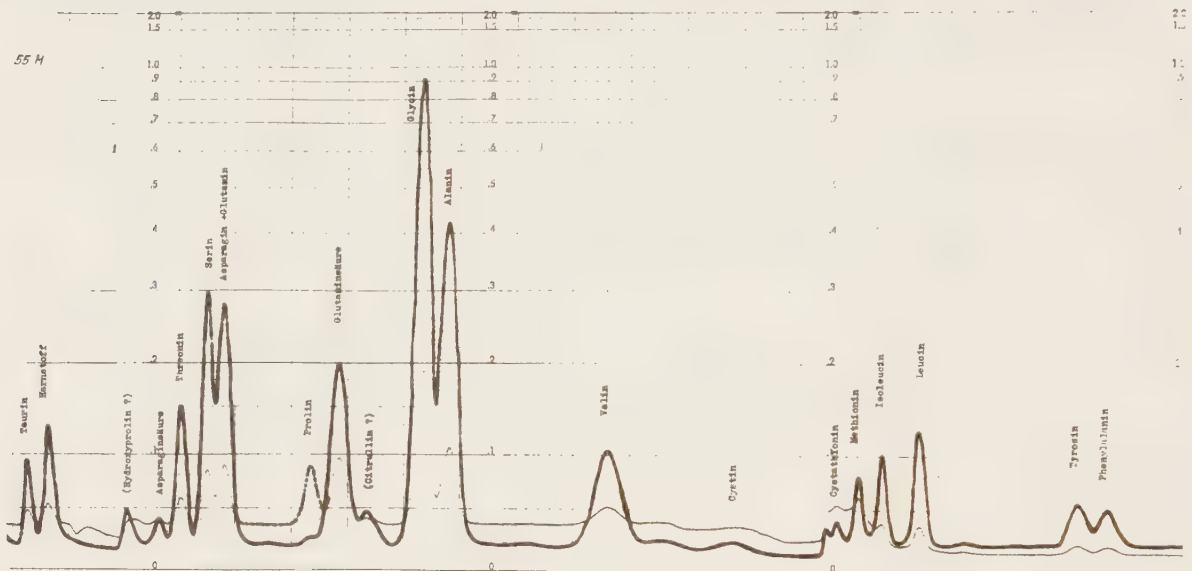
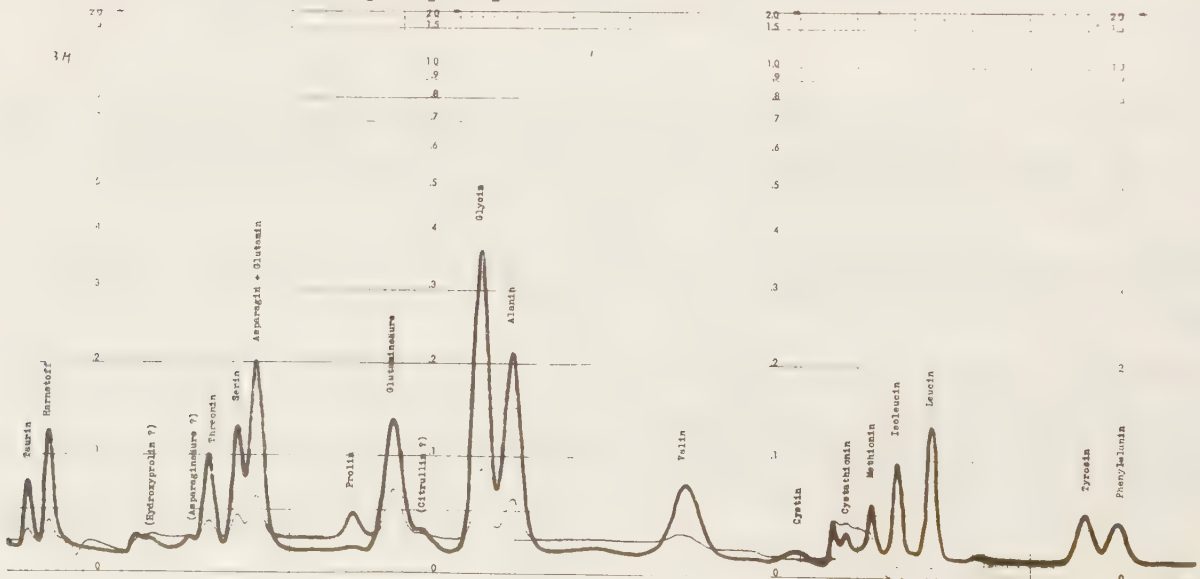


Abb. 22 (unten) - freie AS im mütterlichen Blut (9.d.p.c.) nach Applikation von Cyclophosphamid



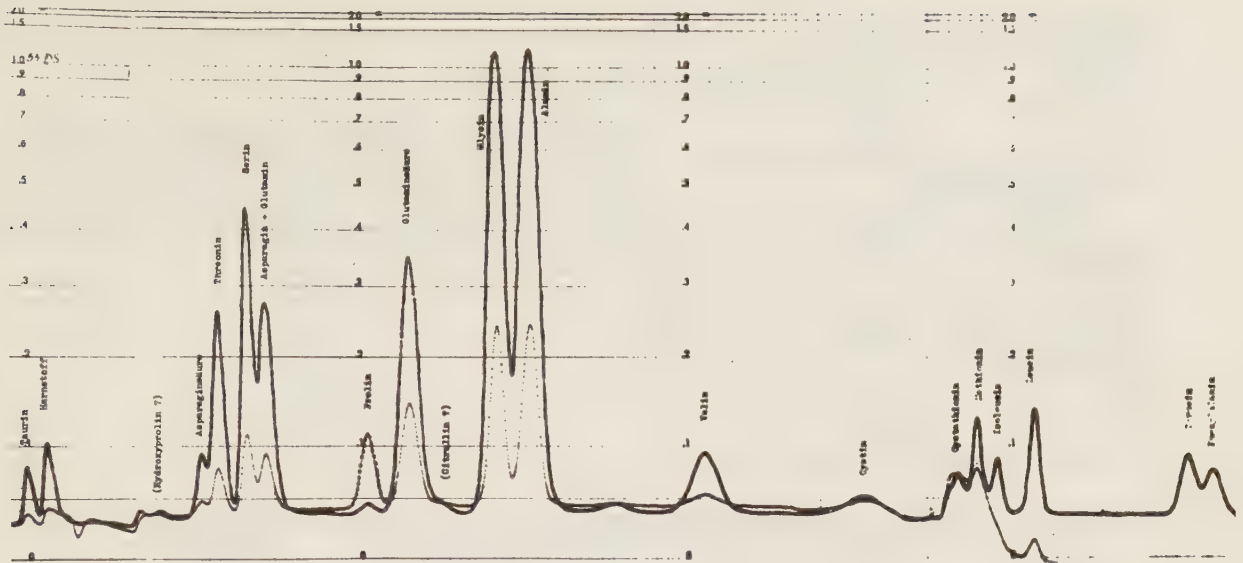
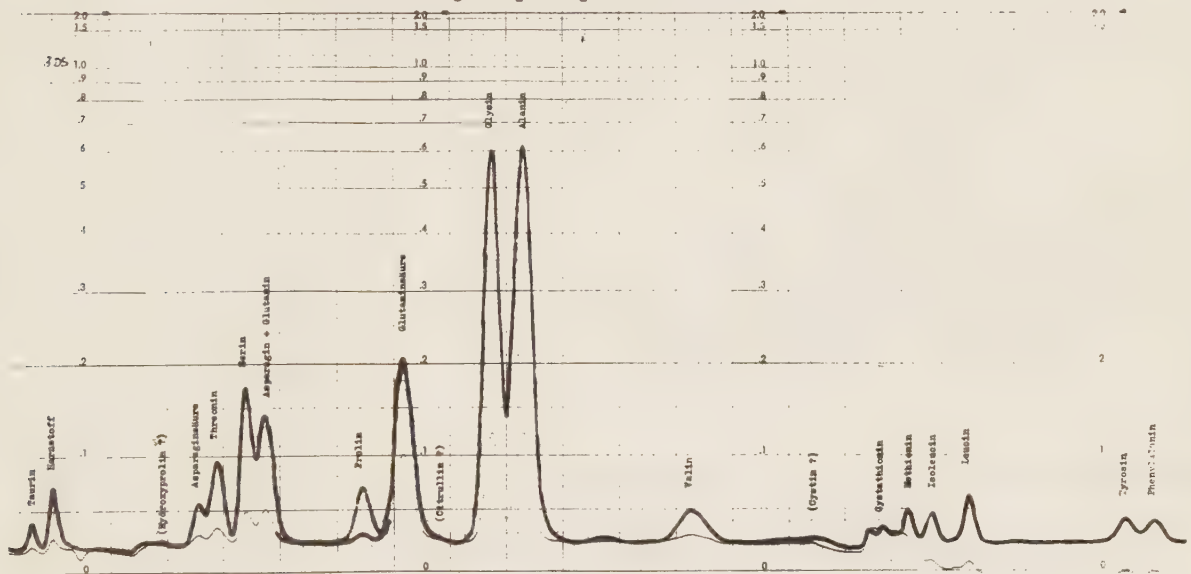


Abb. 23 (oben) - freie AS in der Dottersackflüssigkeit (9.d.p.c.) nach Applikation von physiologischer NaCl (Kontrolle)

Abb. 24 (unten) - freie AS in der Dottersackflüssigkeit (9.d.p.c.) nach Applikation von Cyclophosphamid



Versuch III/CP₆ und III/NaCl₆

Die in den Abbildungen 21 - 24 dargestellten Chromatogramme der sauren und neutralen AS wurden 6 Stunden nach Applikation von Cyclophosphamid, bzw. physiologischer NaCl (= Kontrolle) am 9. Tag der Gestation beim Kaninchen gewonnen. Es zeigten sich bei einigen AS deutliche Konzentrationsabfälle nach Gabe von CP.

BIOCAL - BC 200	
SÄULE LÄNGE	BIO-RAD AMINEX AS 30 cm 0,9 cm
DURCHFLUSSRATE PUFFER NINHYDRIN	60 ml/h 40 ml/h
PUFFER A 4,30, 0,38n B 5,28 0,35n	140 min 100 min
TEMPERATUR A B	32°C 55°C

Tabelle 38 -

Programm zur Trennung der basischen AS im mütterlichen Blut (siehe Abb. 25 und 26) und in der Dottersackflüssigkeit 9 Tage alter Kaninchenembryonen (siehe Abb. 27 und 28, Seite 97).

Abb. 25 (unten) - freie AS im mütterlichen Blut (9.d.p.c.) nach Applikation von physiologischer NaCl (Kontrolle)

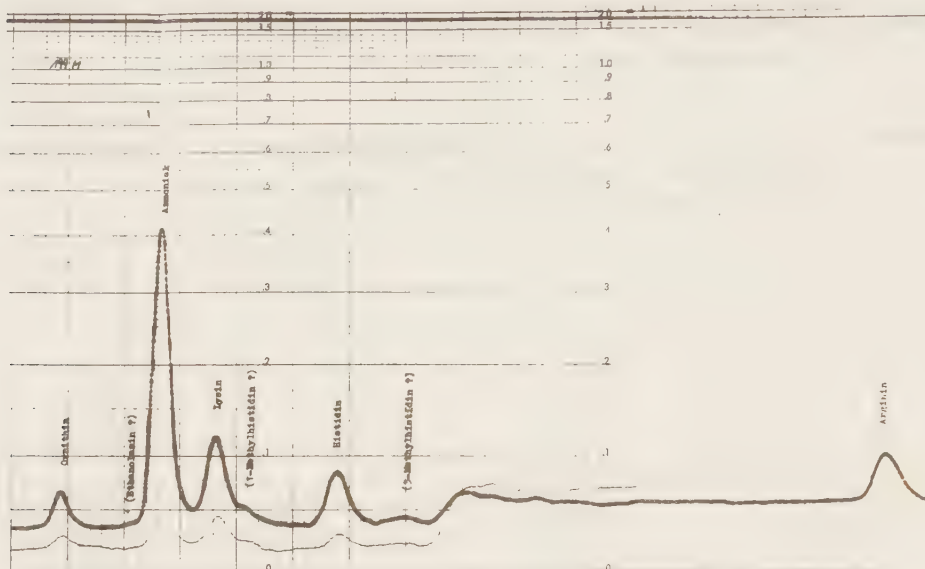
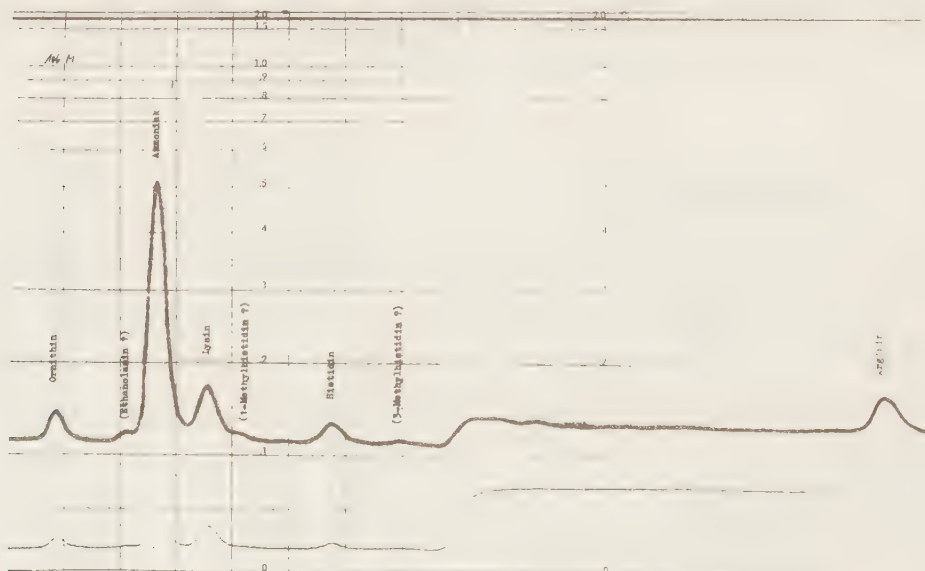


Abb. 26 (unten) - freie AS im mütterlichen Blut (9.d.p.c.) nach Applikation von Cyclophosphamid



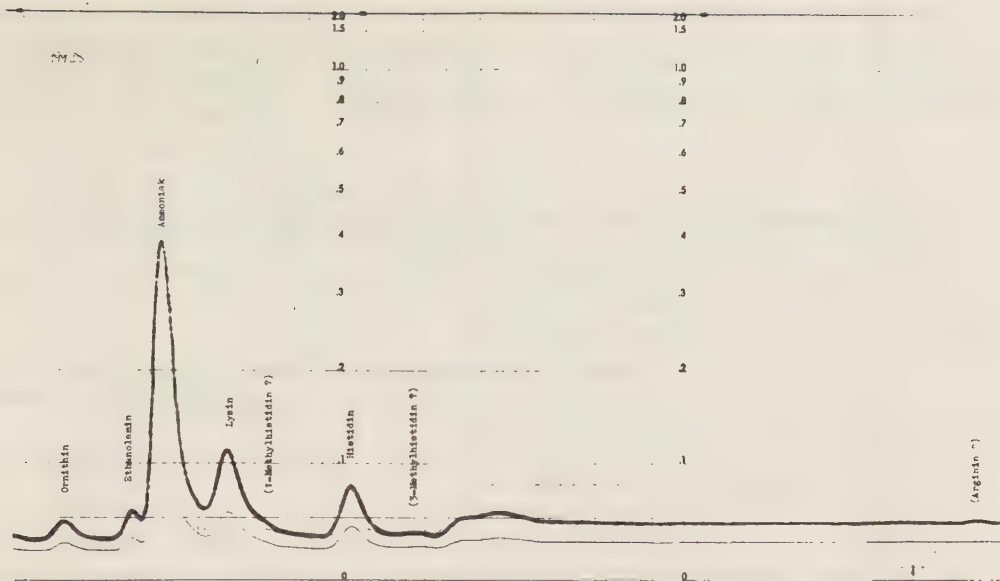
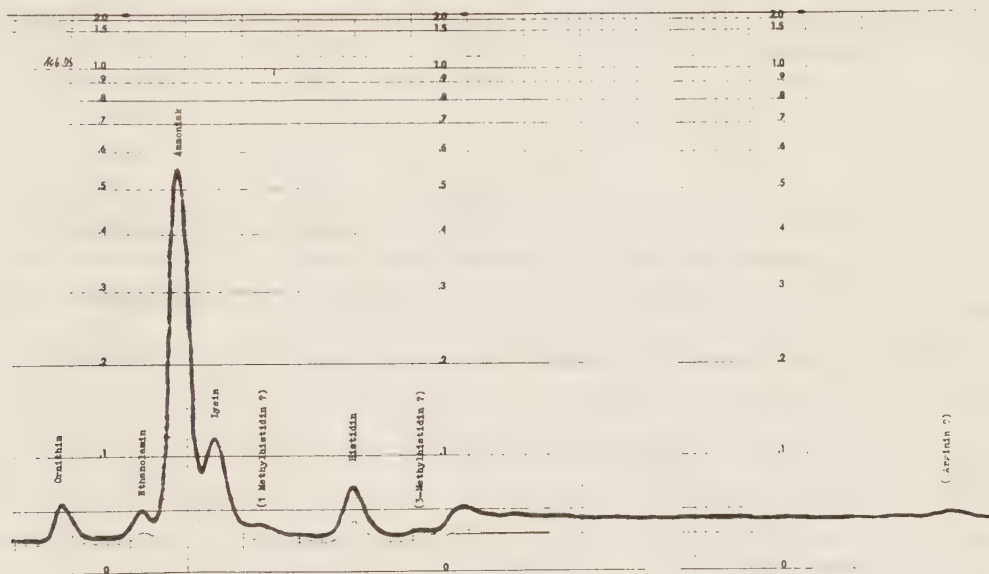


Abb. 27 (oben) - freie AS in der Dottersackflüssigkeit (9.d.p.c.) nach Applikation von physiologischer NaCl (Kontrolle)

Abb. 28 (unten) - freie AS in der Dottersackflüssigkeit (9.d.p.c.) nach Applikation von Cyclophosphamid



Versuch III/CP₆ und III/NaCl₆

Die in den Abbildungen 25 - 28 dargestellten Chromatogramme der basischen AS wurden 6 Stunden nach Applikation von Cyclophosphamid, bzw. physiologischer NaCl (= Kontrolle) am 9. Tag der Gestation beim Kaninchen gewonnen. Es zeigten sich sowohl beim Muttertier, als auch beim Embryo, Konzentrationsabfälle einiger AS; die Veränderungen waren jedoch nicht so deutlich wie bei den sauren und neutralen AS (vergleiche Abb. 21 - 24, Seite 94 f).

12 STUNDEN NACH INJEKTION (n = 6)		mütterl. Blut vor der Operation		mütterl. Blut währ. der Operation		Dottersack- material währ. der Operation	
		$\bar{x}$	$\pm s_x$	$\bar{x}$	$\pm s_x$	$\bar{x}$	$\pm s_x$
pH	physiol.NaCl (Kontrolle)	7,29	0,02	7,26	0,05	6,89	0,13
	Cyclophosphamid + physiol.NaCl	<u>7,24</u>	0,05	7,24	0,04	6,89	0,13
pCO ₂ (mmHg)	physiol.NaCl (Kontrolle)	44,4	6,1	32,1	2,1	68,5	14,3
	Cyclophosphamid + physiol.NaCl	46,0	10,5	<u>22,7</u>	<u>5,9</u>	117,0	<u>50,9</u>
pO ₂ (mmHg)	physiol.NaCl (Kontrolle)	94	11	110	18	104	11
	Cyclophosphamid + physiol.NaCl	99	20	<u>141</u>	16	<u>122</u>	16

Tabelle 39 - Versuch III/CP₁₂ und III/NaCl₁₂; Zusammenstellung der Mittelwerte nach Applikation von CP, bzw. physiologischer NaCl (Kontrolle) - die unterstrichenen Werte sind gegenüber der Kontrolle signifikant unterschiedlich ($p \leq 5\%$).

tration (die Gründe hierfür wurden bereits dargelegt - siehe Seite 43) konnte nicht beurteilt werden, ob es sich um eine respiratorische, oder um eine metabolische Änderung der Stoffwechsellage handelte. Eine respiratorische Komponente scheint wegen des leicht erhöhten pCO₂ eine Rolle zu spielen. Während der Operation blieben die pH-Werte weiterhin erniedrigt. Der CO₂-Partialdruck fiel stark ab, was auf Kompensationsmechanismen hinweisen könnte. Diese Veränderungen im Säure-Basenhaushalt wurden in der Dottersackflüssigkeit nicht beobachtet. Hier fand man eine, wohl operationsbedingte, höhere Streuung der pCO₂-Einzelwerte (siehe auch Tabellenanhang). Die mit CP behandelten Tiere zeigten weiterhin einen Anstieg des pO₂ während der Operation, der, wie auch schon nach 6 Stunden, ebenfalls in der Dottersackflüssigkeit nachweisbar war.

Die durchschnittlichen Natrium-, Kalium- und Calcium-Konzentrationen können Tabelle 40, Seite 99, entnommen werden.

Bei den Natrium-Werten konnten 12 Stunden nach CP-Gabe keine auffälligen Befunde erhoben werden. Die Dottersackwerte lagen, wie schon in den vorangegangenen Versuchen, unter den mütterlichen Werten.

Der im Versuch III/CP₆ (6 Stunden nach Applikation) bei den Muttertieren vor der Operation aufgetretene Kalium-Abfall, sowie in der Dottersackflüssigkeit beobachtete Kalium-Anstieg, konnte nach 12 Stunden nicht weiter verfolgt

Die Konzentrationen der freien AS ergaben beim Muttertier nach CP-Applikation noch zwei signifikante Abweichungen (vergleiche im Gegensatz dazu Versuch III/CP₆, Seite 91):

12 STUNDEN NACH INJEKTION (n = 5) (mg/100ml)	mütterl. Plasma währ. der Operation				Dottersackmaterial währ. der Operation			
	phys. NaCl (Kontrolle)		CP + phys. NaCl		phys. NaCl (Kontrolle)		CP + phys. NaCl	
	$\bar{x}$	$\pm s_x$	$\bar{x}$	$\pm s_x$	$\bar{x}$	$\pm s_x$	$\bar{x}$	$\pm s_x$
TAURIN	1,23	0,21	1,61	0,49	0,90	0,36	1,18	0,54
ASPARAGIN-SÄURE	0,37	0,26	0,19	<u>0,06</u>	0,65	0,43	0,55	0,33
THREONIN	1,85	0,69	1,82	0,88	2,92	1,02	3,41	1,57
SERIN	2,44	0,64	1,99	1,11	5,78	2,17	6,21	1,99
ASPARAGIN/GLUTAMIN	6,41	2,05	6,19	2,71	5,40	1,71	6,92	2,99
PROLIN	3,15	0,53	<u>2,07</u>	0,88	4,37	1,70	4,19	1,75
GLUTAMIN-SÄURE	5,35	2,00	5,05	2,42	9,24	5,40	10,13	4,49
CITRULLIN	1,68	0,91	1,22	0,49	(+)	-	(+)	-
GLYCIN	10,25	3,59	6,94	3,86	15,03	5,12	16,87	4,79
ALANIN	4,48	1,13	4,91	<u>2,98</u>	18,27	8,40	20,73	9,67
VALIN	2,86	0,73	3,16	1,35	2,36	0,66	2,13	0,65
CYSTEIN	1,03	0,72	1,02	0,43	1,22	0,43	0,79	0,51
METHIONIN	0,73	0,32	0,76	0,26	1,10	0,45	0,92	0,54
ISOLEUCIN	1,19	0,39	1,37	0,37	0,63	0,39	0,93	0,38
LEUCIN	2,16	0,64	2,45	0,74	2,33	0,79	1,91	0,75
TYROSIN	1,09	0,43	<u>2,35</u>	0,81	1,74	0,98	2,26	0,81
PHENYLALANIN	0,70	0,31	1,35	0,69	1,13	0,79	1,60	0,69
ORNITHIN	0,71	0,26	0,70	0,31	0,80	0,35	0,84	0,19
ETHANOLAMIN	(+)	-	(+)	-	0,61	0,25	0,71	0,35
LYSIN	3,50	1,36	3,45	1,65	3,63	0,96	3,85	1,54
HISTIDIN	2,12	0,78	1,87	0,57	1,55	0,44	2,01	0,87
ARGININ	2,79	0,70	2,67	1,02	(?)	-	(+)	-

Tabelle 42 - Versuch III/CP₁₂ und III/NaCl₁₂; Zusammenstellung der Mittelwerte nach Applikation von CP₁₂ bzw. physiologischer NaCl (Kontrolle) - der Unterschied der unterstrichenen Werte zur Kontrolle ist signifikant ($p \leq 5\%$). (+) = nur qualitativer Nachweis

Die Prolin-Konzentration lag unter, die Tyrosin-Konzentration über dem Kontrollwert. Bei der Asparaginsäure und beim Alanin fand man eine erhöhte individuelle Streuung (siehe Tabelle 42).

Die Aminosäurengesamtkonzentration (siehe Tabelle 43 und 44, Seite 102) lag beim Muttertier um 5% unter dem Kontrollwert. Die AS in der Dottersackflüssigkeit lagen im Allgemeinen unter den Kontrollwerten; die Gesamtkonzentration war um 11% verringert. Es zeigten sich aber keine Signifikanzen.

12 STUNDEN NACH INJEKTION (n = 5) (mg/100ml)	mütterl. Plasma währ. der Operation				Dottersackmaterial währ. der Operation			
	phys. NaCl (Kontrolle)		CP + phys. NaCl		phys. NaCl (Kontrolle)		CP + phys. NaCl	
	$\bar{x}$	$\pm s_x$	$\bar{x}$	$\pm s_x$	$\bar{x}$	$\pm s_x$	$\bar{x}$	$\pm s_x$
Saure und neutrale Aminosäuren	47,0	13,4	44,6	18,8	73,1	25,9	80,7	27,7
Basische Aminosäuren	9,1	3,0	8,7	3,2	6,6	1,9	7,4	2,5
Aminosäure-Gesamt- konzentration	56,1	16,4	53,3	21,8	79,7	27,7	88,1	29,7

Tabelle 43 (oben)

Tabelle 44 (unten)

12 STUNDEN NACH INJEKTION	mütterl. Plasma	Dottersackmaterial
Saure und neutrale Aminosäuren	- 5 %	+ 11 %
Basische Aminosäuren	- 5 %	+ 13 %
Aminosäure-Gesamt- konzentration	- 5 %	+ 11 %

Versuch III/CP¹² und III/NaCl¹²; Aminosäurengesamtkonzentration nach Appli-
kation von ¹²Cyclophosphamid, bzw. physiologischer NaCl (Kontrolle)

In Tabelle 43 sind die Mittelwerte angegeben; Tabelle 44 zeigt die prozen-
tuale Abweichung vom jeweiligen Kontrollwert

Das Konzentrationsgefälle der oben beschriebenen Werte zwischen Embryo und Muttertier zeigte nach Gabe von CP keine größeren Veränderungen gegenüber der Kontrolle (AS siehe unten). Es fiel auf, daß der Konzentrationsquotient der alkalischen Phosphatasen, der in den bisherigen Versuchen nach CP-Applikation angestiegen war, 12 Stunden nach Gabe des Medikamentes einen gegenüber der Kontrolle abgefallenen Wert zeigte (siehe Tabelle 45 a, Seite 103).

Bei den AS fand man, im Gegensatz zu den vorherigen Versuchen, eine größere Anzahl, deren Konzentrationsgefälle eine Veränderung im Sinne einer Ver-
ringerung des Quotienten erfuhr. Es betraf die AS Valin, Cystin, Methionin
Leucin, Tyrosin und Phenylalanin. Die Gesamtkonzentration war auch 12 Stunden
nach CP-Gabe im Dottersack höher, als im mütterlichen Plasma (siehe Tabelle
45 b, Seite 103).

12 STUNDEN NACH INJEKTION	$\frac{(\text{Konz.})_{\text{DS}}}{(\text{Konz.})_{\text{M}}}$	
Parameter	phys. NaCl (Kontrolle)	CP + phys. NaCl
Na ⁺	1,0	0,9
K ⁺	1,7	1,8
Ca ⁺⁺	0,8	0,8
Ges. Eiweiß	0,7	0,6
Glucose	0,7	0,7
L-Lactat	1,0	1,3
AP	2,1	1,9

Tab. 45 a (oben)

Tab. 45 b
(rechts)

12 STUNDEN NACH INJEKTION	$\frac{(\text{Konz.})_{\text{DS}}}{(\text{Konz.})_{\text{M}}}$	
AS	phys. NaCl (Kontrolle)	CP + phys. NaCl
Tau	0,7	0,7
Asp	1,8	2,9
Thr	1,6	1,9
Ser	2,4	3,1
Asn/Gln	0,8	1,1
Pro	1,4	2,0
Glu	1,7	2,0
Cit	?	?
Gly	1,5	2,4
Ala	4,1	4,2
Val	0,8	0,7
Cys	1,2	0,8
Met	1,5	1,2
Ileu	0,5	0,7
Leu	1,1	0,8
Tyr	1,6	1,0
Phe	1,6	1,2
Orn	1,1	1,2
Eth	?	?
Lys	1,0	1,1
His	0,7	1,1
Arg	?	?
AS-Ges. Konz.	1,4	1,7

Tabellen 45 a/b - Versuch III/CP₁₂ und III/NaCl₁₂; Konzentrationsquotienten zwischen Dottersackflüssigkeit und mütterlichem Blut nach Applikation von CP, bzw. physiologischer NaCl (Kontrolle)

10. DISKUSSION

10.1 VERSUCHSSERIE I - Teratologische Untersuchungen nach intravenöser Applikation von Cyclophosphamid (CP)

CP zeigte nach intravenöser Applikation am 9. Tag der Gestation beim Kaninchen eine embryotoxische Wirkung. Mit steigender Dosis stieg die Zahl der Resorptionen und Mißbildungen.

Nach 80 mg CP/kg KG (Versuch I/3) war auch die Zahl der Feten mit Retardierungszeichen signifikant erhöht.

Die im Kontrollversuch ermittelte Mißbildungsrate (2,7%) und Mißbildungsfrequenz (3,2%) stimmte mit den in der Literatur beschriebenen Werten bei weissen Neuseeländerinnen der gleichen Zucht gut überein (Claussen, 1971; Heinz, 1971; Tabatabai, 1972; Wagner, 1972; Gödde, 1973).

Die in der vorliegenden Arbeit gefundene spontane Resorptionsrate lag mit 15,9% über den von oben genannten Autoren ermittelten Werten. Diese Verschiebung könnte auf den geringen Stichprobenumfang (n = 12 Tiere) zurückgeführt werden. Sie wäre somit als zufällig anzusehen.

Eine ausführliche Literaturübersicht der bisher gewonnenen Ergebnisse über die embryotoxische und teratogene Wirkung von CP ist in Tabelle 1, Seite 13 ff, aufgeführt. Ein Vergleich kann allerdings nur unter Berücksichtigung von Tierspecies, Dosis, Applikationsart und Applikationszeitpunkt sinnvoll durchgeführt werden.

Während einerseits von einigen Autoren nach i.v. Applikation von CP am 9. Tag p.c. beim Kaninchen, wie in der vorliegenden Arbeit, Mißbildungen beobachtet werden konnten (Gottschewski, 1963; Gottschewski und Zimmermann, 1963), wurden andererseits von anderen Autoren unter nahezu den gleichen Bedingungen nur erhöhte Resorptionsraten, jedoch keine Fehlbildungen gefunden (Fritz und Hess, 1971). Diese Autoren applizierten in einer Einzeldosis 30 mg CP/kg KG. Die Resorptionsrate lag bei 18% und zeigte zwischen dem 6. und 14. d.p.c. eine absteigende Tendenz. Bei der Mißbildungsrate und dem Geburtsgewicht fand sich ein biphasischer Verlauf (= 2 Häufigkeitsgipfel). Die beiden Maxima der Mißbildungsrate stimmten mit den Minima der Geburtsgewichte überein. Sie wurden

am 7. und am 12. d.p.c. beobachtet. Am 8. und am 9. d.p.c. konnten keine Fehlbildungen gefunden werden.

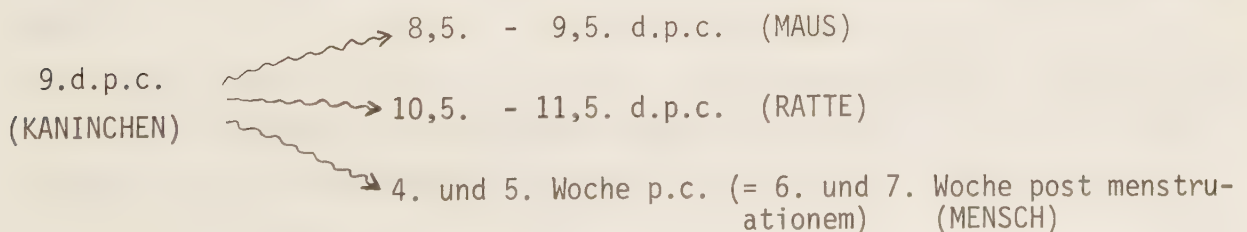
Clavert (1972) beobachtete beim Kaninchen im Embryonalstadium einen biphasischen Verlauf der Mißbildungsrate. Der Autor diskutierte allerdings nur Augenmißbildungen. Fehlbildungen anderer Organe wurden nicht untersucht.

Chaube et al. (1967) fanden bei der Ratte nach CP-Gabe zwei Gipfel in der Resorptionsrate, die zwischen dem 4. und 6. d.p.c. und zwischen dem 9. und 11. d.p.c. lagen.

Betrachtet man die Vorgänge in der Embryonalentwicklung, so stellt man fest, daß beim Kaninchen am 8. und 9. Tag der Gestation der Keim zwar die Implantation in der Uterusschleimhaut abgeschlossen hat, aber ein Stoffaustausch zwischen mütterlichem und embryonalem Blut noch nicht stattfindet. In diesem Zeitraum ist wahrscheinlich die Dottersackmembran die einzige Verbindung zum Muttertier, über die ein Stoffaustausch stattfinden kann.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit stehen, bezüglich der Aussage, ob CP am 9.d.p.c. beim Kaninchen nur embryoletal, oder embryoletal und teratogen wirkt, im Gegensatz zu den Untersuchungen der oben genannten Autoren (vor allen Dingen im Gegensatz zu den Untersuchungen von *Fritz und Hess, 1971*). Man muß allerdings beachten, daß die Autoren die Wirkung höherer Dosen als 30 mg / kg KG nicht prüften. Außerdem handelte es sich bei den, in der vorliegenden Arbeit beobachteten Fehlbildungen des Skelettsystems, um keine schwerwiegenden Schädigungen. Das nach CP aufgetretene Mißbildungsspektrum wies gegenüber der Kontrolle keine grundsätzlichen Unterschiede auf.

Vergleicht man die embryonale Entwicklung des Kaninchens am 9.d.p.c. mit anderen Species, so kann auf Grund der Ergebnisse von *v.Kreybig (1968)*, *Shepardt (1973)* und *Nishimura und Tanimura (1976)* folgender Vergleich gezogen werden:



In den entsprechenden Zeiträumen sind nach CP-Behandlung embryotoxische und teratogene Wirkungen bekannt:

- MAUS - Hackenberg und v.Kreybig (1965), Gebhardt (1970), Metha et al. (1976), Manson und Smith (1977)
- RATTE - Wilson (1964), v.Kreybig (1965 a), v.Kreybig (1965 b), Chaube et al. (1967), Singh (1971), Kloppenburg (1972), Pabst und Wendler (1976)
- MENSCH - Greenberg und Tanaka (1964), Toledo et al. (1971) (beides Fallberichte)

Diese Vergleiche sind nur unter Vorbehalt zu ziehen, da die embryonale Entwicklung der einzelnen Species unterschiedlich abläuft. Ferner sind grundsätzliche Unterschiede in der Reaktion auf eine exogene Noxe, bedingt durch das unterschiedliche genetische Material, nicht auszuschließen (Gottschewski, 1971). Andererseits findet man gerade beim Kaninchen bis zum 13. d.p.c. überraschende Ähnlichkeiten beim Vergleich mit physiologisch gleichalten Mäusen, Ratten und Menschenembryonen (Gottschewski, 1965).

Die Ergebnisse dieser Versuchsserie zeigten, daß die einmalige Applikation von 80 mg CP/kg KG teratogene, wachstumsretardierende und starke embryotetale Wirkungen hatte. Nach Verabreichung von 20- und 40 mg CP/kg KG wurden Veränderungen dieses Ausmaßes nicht gefunden.

10.2 VERSUCHSSERIE II - Standardisierung der Narkose und Beatmungstechnik

Die Äther-Narkose wurde bei Mensch und Tier in ihrem Einfluß auf den Stoffwechsel von zahlreichen Autoren untersucht.

Beispielsweise fanden Bunker et al. (1951) bei Hunden unter Äther-Exposition eine metabolische Azidose mit gesteigerter Milchsäureproduktion. Respiratorische Veränderungen der Stoffwechsellage konnten sie jedoch nicht feststellen.

Dies steht im Gegensatz zu Befunden, die beim Menschen erhoben wurden (*Beecher, 1950*). Als Erklärung wurden von den Autoren speciesbedingte Unterschiede herangezogen.

Gabbard et al. (1952) beobachteten bei extrathorakalen Operationen am Menschen in Äther-Narkose eine gesteigerte Ventilation mit nachfolgender respiratorischer Alkalose.

Diese Ergebnisse wurden von *Kubota et al. (1962)* bestätigt, die ebenfalls unter Äther-Exposition einen verminderten $p\text{CO}_2$ fanden.

Eine ausführliche Beschreibung der Einflüsse einer Äther-Narkose auf den Stoffwechsel gab *Smith (1968)*. Danach kann Äther die Stoffwechsellage sowohl respiratorisch, als auch metabolisch beeinflussen. Auf Grund einer chronischen Hyperventilation kann es nach Meinung des Autors zu einem Abfall der CO_2 -Konzentration im Blut kommen, während Änderungen in der Leber- und Nierenfunktion zu einem chronisch kompensierten Alkalidefizit führen. Außerdem kommt es während einer Äther-Narkose zur vermehrten Ausschüttung der NNR-Hormone (Adrenalin und Noradrenalin). Dies könnte wiederum direkt, oder über einen streßbedingten Mechanismus, eine Hyperventilation nach sich ziehen.

Außerdem wird durch Äther das Herzminutenvolumen auf Grund des positiv-inotropen Effektes der Katecholamine gesteigert (*Jones et al., 1962*).

Eine beobachtete Hyperglykämie (ein intraoperativer Glukoseanstieg wurde auch in den Versuchen dieser Arbeit gefunden) könnte durch vermehrtes Auftreten zirkulierender 17-Hydroxycorticosteroide *Hammond et al., 1958*), oder durch die sympathomimetische Wirkung des Äthers selbst *Brewster et al., 1952*) bedingt sein.

Aus den Versuchen der vorliegenden Arbeit ging hervor, daß die Äther-Narkose unter bestimmten Versuchsbedingungen zu schweren Stoffwechselentgleisungen führen kann.

Folgende Versuchsanordnung erwies sich, zumindest beim Kaninchen, als vorteilhaft:

- 1) Das Inhalationsgemisch mußte schnell anfluten. Bei dem hohen Blut-Gas-Koeffizienten des Äthers von 12,1 (*Conway, 1965*) war eine Sättigung des Blutes frühestens nach 3 - 4 Minuten

erreicht. Durch zu langsames Anfluten (Versuch II/2) kam es beim Kaninchen zu vermehrten Abwehrreaktionen, die zu einer Hypoventilation mit vorübergehendem Anhalten der Amungstätigkeit führte. Ähnliche Beobachtungen wurden auch von *Conway* (1965) beschrieben. Die Folge in den Versuchen der vorliegenden Arbeit war eine respiratorische Azidose mit starkem Anstieg des pCO_2 .

- 2) Die Tiere sollten mit einem Äther-Preßluft-Gemisch beatmet werden. Bei Zumischung von reinem Sauerstoff sollte die O_2 -Gesamtkonzentration, die das Tier erreicht, nicht höher als 35 % betragen. Höhere O_2 -Konzentrationen verminderten den Atemantrieb und führten somit zum Anstieg des pCO_2 (Versuch II/1). Wegen der Gefahr von Mißbildungen müssen zu hohe und zu niedrige Sauerstoffkonzentrationen bei schwangeren Tieren vermieden werden (*Grote, 1965 und 1969*).
- 3) Die Tiere wurden in den Versuchen dieser Arbeit sofort nach Einleitung der Narkose intubiert. Hierdurch verminderte man nicht nur durch Verkleinerung des Todraumes die CO_2 -Rückatmung, sondern es wurde auch eine die Atmung behindernde Verschleimung der oberen Luftwege vermieden.

Die unter den oben beschriebenen, standardisierten Bedingungen behandelten Tiere zeigten nahezu normale pH- und pCO_2 -Werte (siehe Versuch II/3). Prämedikationen (z.B. Atropin) sollten vermieden werden, da sie sonst als zusätzliche Faktoren im teratologischen Experiment diskutiert werden müßten.

Der Vergleich von tragenden (Versuch II/4) und nicht tragenden Tieren (Versuch II/3) zeigte lediglich einen Unterschied zwischen den Standardabweichungen der pCO_2 -Werte. Diese Unterschiede müssen wahrscheinlich auf eine individuell verschiedene Streßanfälligkeit, besonders der tragenden Tiere, zurückgeführt werden. Die pH-Werte waren bei den schwangeren Tieren im Vergleich zur Kontrolle leicht alkalisch. Solche pH-Verschiebungen sind auch beim Menschen bekannt und werden vermutlich während der Schwangerschaft

durch eine leichte Hyperventilation verursacht (*Prystowsky et al.*, 1961).

Jeglicher Streß kann beim Säuger zu Fehlbildungen führen (*Härtel und Härtel*, 1960; *Peters und Strassburg*, 1969). Die Äther-Narkose greift in den Stoffwechsel des Tieres nicht nur metabolisch, sondern auch als Atem-Irritans ein und muß deshalb als Streß-verursachender Faktor aufgefaßt werden.

Mißbildungen am Säuger konnten jedoch bisher, auch nach längerer Exposition, nicht nachgewiesen werden. *Grote und Lennartz* (1968) konnten am Kaninchen nach mehrstündiger Äther-Narkose keine Veränderungen an den Jungtieren finden. Lediglich beim Hühnchenkeim stellte *Smith* (1967) nach 5-stündiger Inkubation mit Äther Mißbildungen bei den Jungtieren fest.

Die vorliegenden Versuche zeigten, daß die Äther-Narkose bei geeigneter Versuchsanordnung die Stoffwechsellage des Kaninchens im geringen Maße beeinflußt. Da bei den direkten Applikationsmethoden und bei Untersuchungen am lebenden Embryo (z.B. die Bestimmung verschiedener Parameter in der Dottersackflüssigkeit in Versuchsserie III dieser Arbeit), eine Narkose unumgänglich ist, hatte die Suche nach geeigneten Narkotika eine besondere Bedeutung.

Die Äther-Narkose schien nach den Erkenntnissen dieser Versuchsserie, und letztlich auch wegen ihrer einfachen Handhabung, für die Versuchsserie III geeignet.

Andere Narkotika sollten, je nach Fragestellung, probeweise beim Kaninchen zur Anwendung kommen, da zum Beispiel bei der Ratte auch Barbiturate (*Persaud*, 1972) und die Neuroleptanalgesie mit Droperidol + Fentanyl = Thalomonal⁰ (*La Barre*, 1962; *La Barre*, 1964) erprobt wurden.

Zusätzliche Versuche sind hierfür notwendig, da bekanntlich Ergebnisse nicht ohne weiteres von einer Species auf eine andere übertragen werden können. Das gilt auch für die Stoffwechselreaktionen auf eine Vollnarkose, die in großem Maße von der Streßanfälligkeit der Individuen abhängig sind.

10.3 VERSUCHSSERIE III - Untersuchungen des mütterlichen Blutes und der Dottersackflüssigkeit nach i. v. Applikation von Cyclophosphamid

10.3.1 Übersicht

Bei der Bestimmung der Normalwerte (Versuch III/N) am 9. Tag der Gestation beim Kaninchen konnten einige, in der Literatur beschriebenen Ergebnisse bestätigt werden.

Andererseits mußten bestimmte, besonders in älteren Veröffentlichungen dargestellte Aussagen über die Zusammensetzung des Keimanlagenmaterials korrigiert werden, weil die in diesen Arbeiten angewandten Meßmethoden mittlerweile veraltet und mit einem größeren Fehler behaftet waren.

Einige Parameter (zum Beispiel die Aktivität der alkalischen Phosphatasen und der Gehalt an freien Aminosäuren) waren bisher in der Dottersackflüssigkeit des Säugers nicht bekannt und wurden in der vorliegenden Arbeit erstmalig beschrieben.

Es zeigte sich weiterhin, daß einige Parameter in der Dottersackflüssigkeit eine andere Konzentration aufwiesen, als sie im mütterlichen Blut gemessen wurde.

Auch operations- und narkosebedingte Abweichungen bei den mütterlichen Werten konnten häufig nicht im gleichen Maße bei den Messungen im Keimanlagenmaterial gefunden werden.

Wahrscheinlich besitzt der Kaninchenembryo zu diesem Zeitpunkt, zur Aufrechterhaltung des Dottersackmilieus, eigene spezifische Funktionsmechanismen, die auch äußere Einflüsse in gewissem Maße ausgleichen können.

Nach Applikation einer embryotoxischen und teratogenen Dosis von Cyclophosphamid (= 80 mg/kg KG) beim Muttertier ergab sich, daß verschiedene, für den Embryo vermutlich bedeutsame Parameter im Dottersackmaterial, Veränderungen gegenüber einer Kontrolle aufwiesen.

Die Möglichkeit, daß die durch CP verursachten Veränderungen in der Zusammensetzung des Keimanlagenmaterials, für die embryoletalen und teratogenen Wirkungen mit verantwortlich waren, konnte nach den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit nicht ausgeschlossen werden.

Die Veränderungen der einzelnen Stoffwechselparameter werden unter den Absätzen 10.3.2 - 10.3.8 zunächst getrennt und im Absatz 10.4 zusammenfassend mit den Ergebnissen der Versuchsserien I und II diskutiert.

10.3.2 pH und Blutgase

10.3.2.1 Normalwerte

Im Versuch III/N (Normalwerte) ergaben sich am 9.d.p.c. pH-Werte in der Dottersackflüssigkeit, die zwischen 6,83 und 7,31 lagen. Der Mittelwert betrug 7,05 (n = 20).

Die Untersuchungen von *Lutwak-Mann und Laser (1954)*, *Schwick (1965)* und *Petzoldt (1971)* zeigten im Keimanlagenmaterial pH-Werte zwischen 7,5 und 8,4. Die Versuche wurden allerdings beim Kaninchen zwischen dem 6. und 8. Tag p.c. durchgeführt.

Diese Ergebnisse weichen von den eigenen Werten ab. Das muß einerseits auf den früheren Schwangerschaftszeitpunkt, andererseits aber auch auf die andere Labormethodik zurückgeführt werden.

Da es in den früheren Jahren noch keine pH- und Blutgas-Analysatoren gab, wurden die Messungen mit Indikatoren und Glaselektroden durchgeführt. Dies bewirkte ein rasches Entweichen von CO₂, weil ein luftdichter Abschluß der Untersuchungsproben während der Messungen nicht möglich war. Ein CO₂-Verlust führt zur Alkalisierung (*Rick, 1974*). Bei der in dieser Arbeit angewandten Mikromethode konnte dieser Fehler vermieden werden. Dies führte zu niedrigeren pH-Werten.

Kenntnisse über den CO₂- und O₂-Partialdruck im Keimanlagenmaterial des Kaninchens am 9.d.p.c. lagen bisher noch nicht vor.

Die CO₂-Drucke waren in der Dottersackflüssigkeit mit durchschnittlich 57,6 mmHg wesentlich höher, als im mütterlichen Blut, sowohl vor, als auch während der Operation. Eine operationsbedingte Beeinflussung, im Sinne einer respiratorischen Azidose, ist nicht wahrscheinlich. Wäre die pCO₂-Erhöhung auf die Operation zurückzuführen, so hätten auch beim Muttertier erhöhte Werte gefunden werden müssen.

Der pO_2 in der Dottersackflüssigkeit lag bei durchschnittlich 115 mmHg. Die Werte im mütterlichen Blut waren vor der Operation niedriger, während der Operation höher, als im Keimanlagenmaterial. Eine operationsbedingte Beeinflussung des pO_2 im Dottersack war auch hier unwahrscheinlich. Wenn die Muttertiere sehr hohe pO_2 -Werte aufwiesen, waren in den entsprechenden Dottersäcken keine ähnlichen Erhöhungen zu finden.

Das Keimanlagenmaterial scheint, was den Sauerstoffpartialdruck betrifft, von der Mutter weitgehend unabhängig zu sein und eigene Regulationsmechanismen zu besitzen.

Diese Vermutung wurde durch die Untersuchungen von *Chelius und Künzel* (1972) bestärkt, die beim Meerschweinchen, allerdings im späten Fetalstadium, fanden, daß ein O_2 -Überangebot an die Mutter nicht zu höheren O_2 -Werten im fetalen Blut führte. Außerdem konnte weder eine Hypo- noch eine Hyperventilation den fetalen pO_2 entscheidend verändern.

10.3.2.2 Veränderungen nach Applikation von CP

1 Stunde nach Applikation von CP (Versuch III/CP₁) deuteten die pH- und pCO_2 -Veränderungen im Dottersack auf das Vorliegen einer metabolischen Alkalose hin, die auch beim Muttertier (vor der Operation) beobachtet werden konnte.

Metabolische Alkalosen sind zumindest beim Menschen selten, und treten unter anderem auf, wenn es durch intrazelluläre Kaliumverluste (z.B. bei Zellmembranschädigungen) zu Verschiebungen der extra-intra-zellulären Wasserstoffionenverteilung kommt. Der intrazelluläre Kaliumverlust wird durch Natrium und H^+ -Ionen ersetzt (*Siegenthaler, 1973*), deren Fehlen im extrazellulären Raum zur Alkalose führt.

Tatsächlich war neben dem erhöhten pH auch eine geringgradige Natrium-Erniedrigung zu beobachten.

Es ist bekannt, daß pH-Verschiebungen zu Fehlbildungen führen können (*Abramovici, 1973; Dostal, 1973; Haring, 1966*).

Zu den späteren Zeitpunkten (3, 6 und 12 Stunden nach CP-Gabe - Versuch III/CP₃, III/CP₆ und III/CP₁₂) waren in der Dottersackflüssigkeit keine größeren Abweichungen bei den pH-Werten gegenüber der Kontrolle zu finden.

Auch die pCO_2 -Werte lagen im Normbereich.

Ob diese Tasche für Reparationsmechanismen spricht, die möglicherweise zwischen 1 und 3 Stunden nach CP-Gabe wirksam wurden, konnte in diesen Versuchen nicht geklärt werden. Hierzu müßten Untersuchungen in kürzeren Zeitabständen nach der Applikation erfolgen, die einen genaueren Aufschluß über das zeitliche Verhalten der Stoffwechseländerungen geben würden. Das Puffersystem im Uterus und in den Tuben des Kaninchens, welches pH-Verschiebungen ausgleichen kann, hat jedenfalls im Vergleich zum Puffersystem des restlichen mütterlichen Organismus eine größere Kapazität (*Viswakarma, 1962*).

Für die Erhöhung der CO_2 -Partialdrucke in der Dottersackflüssigkeit im Versuch III/ NaCl_3 (= Kontrolle, 3 Stunden nach NaCl -Gabe) konnte keine Erklärung gefunden werden. Bei diesen Tieren zeigten die anderen Parameter keine auffälligen Abweichungen.

Die pO_2 -Werte waren 6 und 12 Stunden nach CP-Applikation sowohl bei den Muttertieren (während der Operation), als auch in der Dottersackflüssigkeit erhöht. Diese Veränderungen traten jedoch, zumindest beim Muttertier, nicht vor der Operation auf, sondern nur unter dem Einfluß des Narkotikums oder der operationsbedingten Streßsituation. Auch die Kontrolltiere zeigten während der Operation keine Veränderungen in diesem Ausmaße.

Als Erklärung hierfür sind zwei Ursachen denkbar. Entweder kam es durch die Doppelbelastung (Operation + CP-Exposition) zur Überschreitung einer Toleranzgrenze, so daß eigene Gegenregulationen versagten. Durch die einfache Belastung (nur Operation wie bei den Kontrolltieren, nur CP-Belastung ohne Operation wie bei den Muttertieren vor der OP) wurde diese Grenze nicht erreicht. Eine andere Ursache könnte darin liegen, daß zwischen dem Narkotikum und CP, oder der Streßsituation (z.B. Ausschüttung von Katecholaminen) und CP gewisse Interaktionen auftraten, durch die sich die einzelnen Wirkungen verstärkten oder gar potenzierten.

Die Veränderungen des pO_2 im mütterlichen Blut und in der Dottersackflüssigkeit mußten CP-bedingt sein, da sie in der Kontrolle nicht auftraten. Es kann jedoch die Möglichkeit nicht ausgeschlossen werden, daß sich der O_2 -Partialdruck im Dottersack ohne die operationsbedingte Belastung, aber nach CP-Behandlung, nicht verändert hätte, ähnlich wie der mütterliche Wert vor der Narkose.

10.3.3 Natrium, Kalium und Calcium

10.3.3.1 Normalwerte

Die am 9.d.p.c. bestimmten Normalwerte (Versuch III/N) lagen in der Dottersackflüssigkeit im Durchschnitt für Natrium bei 136 mval/l, für Kalium bei 5,5 mval/l und für Calcium bei 11,0 mg/100ml.

In der Literatur wurden keine Werte für diesen Schwangerschaftszeitraum (9.d.p.c.) gefunden.

Die von anderen Autoren am 8., 8,5. und 10. Tag der Gestation beim Kaninchen bestimmten Elektrolytwerte stimmten mit den eigenen Ergebnissen gut überein (Lewis und Lutwak-Mann, 1954; Lutwak-Mann, 1959; Gottschewski und Zimmermann, 1973).

Die von Petzoldt (1971) beschriebenen Kalium-Werte bei 7 Tage alten Blastozysten lagen mit 10,9 mval/l sicherlich zu hoch. Wegen der geringfügigen Probenmenge konnte der Autor das Material vor der Bestimmung nicht zentrifugieren. Zellverunreinigungen erhöhen den Kaliumgehalt einer Flüssigkeit. Außerdem wurden die Untersuchungen bei zuvor getöteten Tieren durchgeführt, was nach Angaben des Autors auch Erhöhungen des Kaliums verursachte.

In den Versuchen der vorliegenden Arbeit konnten diese methodisch bedingten Fehler vermieden werden.

Die oben genannten Autoren stimmten darin überein, daß der Kaliumgehalt im Keimanlagenmaterial höher liegt, als im mütterlichen Serum. Dies konnten in den vorliegenden Untersuchungen bestätigt werden. Der Konzentrationsquotient zwischen Dottersack-Gehalt und Konzentration im mütterlichen Serum betrug 1,5.

Zwischen dem 6. und 7. Tag der Gestation fand Petzoldt (1971) eine starke Kaliumzunahme in der Blastozystenflüssigkeit.

Lutwak-Mann (1959) beobachtete dagegen zwischen dem 6. und 8. d.p.c. eine abfallende Tendenz der Kaliumkonzentration, die sich am 8. d.p.c. zwischen 4,5 und 6,5 mval/l einpendelte.

In weiteren Untersuchungen zeigten Lutwak-Mann et al. (1960), nachdem sie

radioaktiv markierte Ionen beim Kaninchen zwischen dem 0. und 12. Tag der Gestation injiziert hatten, daß die Ionenaufnahme in die Keimanlage (eine Ausnahme bildete $^{42}\text{K}^+$) am 8. d.p.c. am stärksten war.

Für Kalium wurde am 7. d.p.c. die größte Ioneninkorporation gemessen. Da die embryonale Konzentration unabhängig von der im Uterus gemessenen Ionenkonzentration war, diskutierten die Autoren embryospezifische Mechanismen, die das osmotische Gleichgewicht in der Keimanlage, unabhängig von den mütterlichen Stoffwechselgegebenheiten, steuern.

Die Existenz von embryoeigenen Funktionen zur Kontrolle der Ionenbewegungen wurde auch von *Hughes (1975)* diskutiert.

Bei der Aurechterhaltung dieser Funktionen könnten die Trophoblastenzellen einen entscheidenden Anteil haben (*Lutwak-Mann et al., 1960; Petzoldt, 1971*).

Nach Behandlung mit Trypan-Blue, einem Azofarbstoff, durch den die Aufnahme von Makromolekülen in den Dottersack verhindert werden kann (*Williams et al., 1973*), und der teratogene Wirkungen zeigt (*Lloyd et al., 1974*), fanden sich keine Änderungen in der embryonalen Ionenaufnahme (*Lutwak-Mann et al., 1960*). Die, für den aktiven Ionentransport (*Smith, 1970; Cross, 1973*) in den Dottersack verantwortlichen Mechanismen, werden durch Trypan-Blue also nicht beeinflußt.

Über die Bedeutung der Calcium-Ionen in der embryonalen Entwicklung ist noch wenig bekannt.

Beim erwachsenen Menschen stellt das Calcium etwa 1,5% des gesamten Körpergewichtes dar und hat neben einer komplexen Stoffwechselbedeutung (z.B. im Muskel und Knochen) einen Anteil an der intrazellulären Kittsubstanz (*Ganong, 1972*).

10.3.3.2 Veränderungen nach Applikation von CP

Deutliche Veränderungen in den Elektrolytkonzentrationen der Dottersackflüssigkeit waren erst 6 Stunden nach Applikation von CP zu beobachten.

Während die Natrium- und Calcium-Werte unter der Kontrolle lagen, stieg die Kalium-Konzentration an.

Ein leichter Anstieg des Kalium-Gehaltes, der aber nicht signifikant war, zeigte sich allerdings schon 1 und 3 Stunden nach Applikation. 1 Stunde nach CP-Gabe war einer der sechs Werte mit 6,8 mval/l und 3 Stunden danach schon zwei Werte mit 7,3 und 7,8 mval/l stark erhöht, was zu der leichten Veränderung der Mittelwerte führte. Außerdem war die Standardabweichung gegenüber der Kontrolle erhöht.

Nach 6 Stunden zeigte sich, ähnlich wie beim O_2 -Partialdruck, daß die Kalium-Werte in der Dottersackflüssigkeit ein vom Muttertier unabhängiges Verhalten aufwiesen. Während der Kalium-Gehalt im mütterlichen Serum unter den Kontrollwerten lag, war die entsprechende Konzentration im Keimanlagenmaterial erhöht.

Hyperkaliämien sind nach CP-Behandlung bei Menschen mit schnell nekrotisierenden Tumoren bekannt und auch im Tierexperiment an Mäusen, die zuvor mit Tumorzellen beimpft worden waren, nachgewiesen (*Arseneau et al.*, 1973). Dies ist auf den erhöhten Zellzerfall des Tumorgewebes zurückzuführen.

Da embryonale Zellen wegen ihrer hohen Proliferationsrate eine gewisse Ähnlichkeit mit Tumorzellen besitzen, ist es denkbar, daß auch die im Dottersack beobachtete Kalium-Erhöhung durch einen verstärkten Zelluntergang im Embryo, bzw. in der Dottersackwand zustande kam.

Hohe CP-Dosen führten aber andererseits bei Tieren ohne Tumoren zu einer Kalium-Verringerung (*Lee et al.*, 1973). Dies stimmte mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit überein, in der die Kalium-Werte im mütterlichen Serum nach 3, 6 und 12 Stunden, sowohl vor, als auch während der Operation gegenüber der Kontrolle erniedrigt waren.

Die Calcium-Konzentrationen im Dottersack fielen nach CP-Behandlung von 10,7 mg/100 ml nach 1 Stunde, auf 8,9 mg/100 ml nach 12 Stunden ab. Die behandelten Muttertiere hatten ebenfalls eine geringere Serum-Calcium-Konzentration, als die entsprechenden Kontrolltiere. Während der Operation fielen die Werte noch weiter ab. Nach 12 Stunden war der Unterschied signifikant.

Ob die verringerte Calcium-Konzentration im Dottersack auf einen Verlust, oder auf eine mangelhafte Zufuhr aus dem mütterlichen Serum, wo selber ein Defizit herrschte (siehe oben), zurückzuführen war, konnte nicht geklärt werden. Weiterhin konnten nur Vermutungen darüber angestellt werden, ob durch eine zytostatische Therapie mit CP, auf Grund der Bedeutung der Calcium-Ionen bei der interzellulären Kittsubstanz, Änderungen im Cal-

cium-Haushalt auftraten, und inwieweit die zytotoxischen und antitumoralen Eigenschaften dieser Substanz auch mit Schädigungen des Zellverbandes an sich begründet werden können.

Die niedrigen mütterlichen Kalium- und Calcium-Werte nach CP-Behandlung paßten zu den Beobachtungen, die beim Menschen von *Steele et al.* (1973) gemacht wurden. Die Autoren fanden auf Grund einer gestörten Wasserausscheidung eine antidiuretische Wirkung von CP. Sie diskutierten einerseits einen direkten Effekt der CP-Metabolite auf den distalen Tubulus der Niere, andererseits die endogene Bildung eines antidiuretischen Hormons. Eine zu erwartende gleichzeitig auftretende Hyponatriämie konnte bei den hier untersuchten Kaninchen aber nicht festgestellt werden. Dies sprach jedoch auf Grund der Speciesunterschiede nicht gegen die Hypothese einer antidiuretischen Wirkung von CP.

Die frühe embryonale Entwicklung scheint in einem großen Maße von ganz bestimmten Ionenverhältnissen abhängig zu sein, die durch bisher noch unbekannte, spezifische Mechanismen gesteuert werden. Veränderungen des osmotischen Gleichgewichtes können zu Mißbildungen und zum embryonalen Tod führen (*Conti, 1964; Hartley, 1967; Nishimura, 1969; Wagner, 1971; Tabatabai, 1972; Dostal, 1973; Gödde, 1973*).

In Skandinavien wurden durch Injektionen von hypertonen NaCl-Lösungen in die Amnionhöhle menschlicher Embryonen Aborte hervorgerufen (*Gustavii, 1971; Kivikski und Pulkkinen, 1971*).

Bei allen oben genannten Versuchen wurden jedoch starke Elektrolytverschiebungen bei der Mutter, oder beim Embryo provoziert. Bei leichteren Veränderungen der osmotischen Verhältnisse, wie sie zum Beispiel bei therapeutischen Dosen einiger Diuretika auftreten, wurden keine embryotoxischen und teratogenen Effekte beobachtet (*Kraus et al., 1966; Gjonaess, 1968; Landesman, 1968; Stamm, 1970; Merenstein, 1970*).

Welche Elektrolytverschiebungen der Embryo noch toleriert, und inwieweit überhaupt Veränderungen der osmotischen Verhältnisse zu Fehlbildungen führen können, ist bisher nicht eindeutig geklärt.

Nach *Grote (1969)* müssen Änderungen der Elektrolytkonzentrationen bei der Schwangeren solange als mißbildungserzeugend angesehen werden, bis das Gegenteil bewiesen ist (dysionische Genese der Mißbildungen).

Die Möglichkeit, daß die embryotoxische und teratogene Wirkung von CP auch über eine Verschiebung der Elektrolyte zustande kam, konnte nicht ausgeschlossen werden. Allerdings schien, zumindest was die Abweichungen der Kalium-Konzentrationen im Dottersack betraf, die Ionenverschiebungen eher sekundär (z.B. durch Zelluntergang) entstanden zu sein.

Es konnte nicht geklärt werden, ob der Abfall der Natrium-Werte im Versuch III/CP₆ in einem Zusammenhang mit dem Anstieg des Kaliums stand. Ein direkter Austausch der beiden Ionen, auf Grund von Zellmembranschädigungen, ist denkbar. Andererseits muß man aber auch an die Schädigung spezifischer Funktionen in der Dottersackwand denken.

Der Kationentransport ist von Energie und somit indirekt von der Atmung abhängig. Bei verstärktem Transport von bestimmten Stoffen im Organismus kommt es zu einer Intensivierung der Atmung und der Glykolyse. Die Ionenwanderung wird durch die Na⁺- K⁺- aktivierbare ATP-ase gesteuert. Eine Hemmung dieses Enzymsystems führt zu einem Stillstand des Kationentransportes (*Rapoport, 1973*).

Es wäre denkbar, daß die CP-Metabolite über eine DNS-Synthese-Hemmung, wie sie von *Murthy et al. (1973)* beobachtet wurde, auch einen Einfluß auf die Enzymbildung haben.

Wäre es über diesen Mechanismus zu einer Blockierung des Transport-ATP-ase-systems gekommen, hätte die zur Aufrechterhaltung eines Konzentrationsquotienten stattfindende Kationenwanderung aufhören müssen. Man hätte dann einen Konzentrationsausgleich zwischen mütterlichem Blut und der Dottersackflüssigkeit erwartet.

In den Versuchen der vorliegenden Arbeit konnten jedoch keine entsprechenden Veränderungen beobachtet werden. Die Unterschiede zwischen mütterlicher und embryonaler Ionenkonzentration wurde nach CP-Gabe gegenüber der Kontrolle eher noch größer.

Den Natrium-Ionen kommt im Elektrolythaushalt des Zellkernes eine besondere Bedeutung zu. Der Natrium-Gehalt des Zellkernes entspricht nicht der Konzentration von Natrium im Zytoplasma, was anzunehmen wäre, sondern der Konzentration im Außenmedium. Möglicherweise steht die Kernhülle über das endoplasmatische Retikulum auch funktionell mit dem extrazellulären Raum in Verbindung. Versuche an isolierten Zellkernen zeigten weiterhin, daß sich in einer Kalium-Chlorid-Lösung Puffs induzieren ließen. Dies legte die Vermutung nahe, daß die Genaktivität auch durch die Ionenverhältnisse der umgebenden Lösung

beeinflußt werden könnte (*Bielka, 1973*).

In der Dottersackflüssigkeit, der mit CP-behandelten Tiere, war eine Erhöhung der Kalium-Konzentration zu beobachten. Ob dies mit einer vermehrten, oder veränderten Genaktivität der embryonalen Zellen, verursacht durch CP, im Zusammenhang stand, müßte in einer anderen Versuchsanordnung gesondert geklärt werden.

Betrachtet man die oben aufgezeigten Möglichkeiten, die zu einer Kalium-Erhöhung führen können, so scheint in erster Linie jedoch ein Zelluntergang als Ursache für die Kalium-Konzentrationserhöhung in der Dottersackflüssigkeit in Frage zu kommen. Diese Annahme wurde durch die hohe Resorptionsrate im Teratogenversuch (siehe Versuchsserie I) bestärkt.

Eine Beeinflußung des Transportenzymsystems in der Dottersackwand und eine Verschiebung der Ionenkonzentration durch Veränderungen der Genaktivitäten, lassen sich als weitere Ursache nicht völlig ausschließen.

10.3.4 Gesamteiweiß

10.3.4.1 Normalwerte

Die Bestimmung der Normalwerte (Versuch III/N) ergab eine mittlere Eiweißkonzentration in der Dottersackflüssigkeit von 3,8 g/100 ml. Die mütterlichen Werte im Serum lagen durchschnittlich bei 5,2 g/100 ml vor der Operation und 5,3 g/100 ml während der Operation.

Hafez und Sugawara (1968) fanden bei weißen Neuseeländerinnen am 9. Tag der Gestation eine Dottersackeiweißkonzentration von 2,7 g/100 ml.

In früheren Entwicklungsstadien liegt der Proteingehalt wahrscheinlich noch niedriger und steigt bis zur Nidation (6. - 7. d.p.c.) kontinuierlich an (*Lutwak-Mann, 1954; Schwick, 1965; Hafez und Sugawara, 1968; Petzoldt, 1971*).

Ab dem 8. d.p.c. ist im Keimanlagenmaterial Fibrinogen nachweisbar (*Schwick, 1965*). Die Bedeutung dieses Eiweißes in der embryonalen Entwicklung ist noch unbekannt.

Höhere Fibrinogenkonzentrationen in Tumorzellen (*Keil, 1954*) ließen an eine Stimulierung der Zellproliferation denken. Andererseits könnte aber beim Embryo

das Netzwerk von polymerisierten Fibrinfasern als Matrix für die Bildung von Zellverbänden diskutiert werden (*Schwick, 1965*).

Die Identifizierung der im Dottersackmaterial vorhandenen Proteine ist noch nicht vollständig abgeschlossen.

Während *Brambell und Hemmings (1949)* noch annahmen, daß die Dottersackflüssigkeit am 9. d.p.c. beim Kaninchen die gleiche qualitative Zusammensetzung aufweist, wie man sie im mütterlichen Plasma vorfand, konnten in den letzten Jahren uterus- und blastozystenspezifische Proteine nachgewiesen werden (*Schwick, 1965; Kirchner, 1969*).

Wie bei der Aufrechterhaltung und Steuerung der Ionenverhältnisse scheinen auch beim Proteinstoffwechsel in der Keimanlage die Trophoblastenzellen eine besondere Rolle zu spielen (*Petzoldt, 1971*).

Die von *Schwick (1965)* gemessenen Eiweißkonzentrationen im Serum von schwangeren Häsinnen lagen zwischen 5,0 und 6,5 g/100 ml und stimmten mit den eigenen Ergebnissen überein.

10.3.4.2 Veränderungen nach Applikation von CP

Nach Applikation von CP wurden keine größeren Abweichungen in der quantitativen Eiweißzusammensetzung der Dottersackflüssigkeit gegenüber der Kontrolle gefunden. Eine leichte Verringerung der Proteinkonzentration im Keimanlagenmaterial nach 3, 6 und 12 Stunden ließ sich statistisch nicht absichern. Der Gesamteiweißgehalt im mütterlichen Serum zeigte dagegen 6 Stunden nach CP-Gabe, sowohl vor, als auch während der Operation, eine signifikante Erhöhung gegenüber den Kontrollwerten. Zu den anderen Zeitpunkten konnten nur geringfügige Veränderungen beobachtet werden.

Short und Gibson (1973) äußerten die Vermutung, daß nach Gabe von 80 mg CP/kg KG bei neonatalen Mäusen wahrscheinlich eher qualitative, als quantitative Änderungen in der Proteinsynthese auftreten. Die Autoren bestimmten die Aufnahme von radioaktiv markiertem Leucin in die Eiweiße. Sie untersuchten weiterhin den Einbau von markiertem Thymidin und Uridin in die DNS und RNS. Eine Beeinflussung der Proteinsynthese, gemessen am Leucineinbau, konnten sie nicht feststellen. Sie diskutierten, daß die wachstumshemmende Wirkung von CP ver-

mutlich auf eine DNS- und RNS-Synthesehemmung zurückzuführen sei. Der Einbau der radioaktiv markierten Purin- und Pyrimidinbasen war nach CP-Behandlung vermindert.

Murthy et al. (1973) untersuchten nach Behandlung mit ^3H -markiertem CP die Radioaktivität in der DNS und den Proteinen von 10 Tage alten Mäuseembryonen. Sie injizierten den Muttertieren 10 und 20 mg radioaktiv markiertes CP/kg KG intraperitoneal. Dabei zeigte die Bindung der ^3H -markierten CP-Bestandteile an die DNS eine positive Korrelation zu den teratologischen Effekten. Die Bindung an die embryonalen Proteine und RNS-Moleküle war dagegen nicht mit den beobachteten Fehlbildungen korreliert.

Die Aufnahme hochmolekularer Stoffe in die Zelle erfolgt mit Hilfe der Phago- und Pinozytose. Diese Vorgänge sind energieabhängig (*Ganong, 1973*).

Auch an der Dottersackmembran konnten bereits Pinozytose- (*Sonoda et al., 1973*) und Phagozytose-Aktivitäten (*Franke und Goetze, 1972*) beobachtet werden.

Durch chemische Noxen, spezifische Antikörper und Röntgenstrahlen ließen sich diese Transportvorgänge hemmen und auch Mißbildungen erzeugen (siehe Kapitel 5: *Franke und Goetze, 1972; Williams et al., 1973; Lloyd et al., 1974*).

Ob die geringfügigen, in der vorliegenden Arbeit aufgetretenen Proteinverringeringen in der Dottersackflüssigkeit der behandelten Tiere auf eine Störung der Pino-, oder Phagozytose zurückzuführen sind, müßte aber elektronenmikroskopisch geprüft werden können.

10.3.5 Glukose

10.3.5.1 Normalwerte

Die in der Dottersackflüssigkeit bestimmten Normalwerte (Versuch III/N) lagen zwischen 64 und 158 mg/100 ml. Es ergab sich ein Mittelwert von 101 mg/100 ml.

Die Untersuchungen von *Lutwak-Mann (1962)* ergaben am 9.d.p.c. einen Durchschnittswert von 80 mg/100 ml.

Hafez und Sugawara (1968) stellten während des gleichen Schwangerschaftszeitraumes eine große individuelle Streuung bei ihren Versuchstieren fest. Die

in der Dottersackflüssigkeit von weißen Neuseeländerinnen gemessenen Glukosewerte lagen zwischen 62 und 121 mg/100 ml.

Die mütterlichen Glukosekonzentrationen zeigten während der Operation einen starken Anstieg, der durch die sympathomimetische Wirkung des Äthers und die operationsbedingte Streßsituation erklärbar war (siehe auch Absatz 10.2).

Während bei *Lutwak-Mann (1962)* der Glukosegehalt des mütterlichen Blutes mit 100 mg/100 ml um 20 mg/100 ml über der embryonalen Konzentration lag, waren in der vorliegenden Arbeit die mütterlichen Werte vor der Operation mit durchschnittlich 94 mg/100 ml niedriger, als die entsprechenden Dottersackwerte. Ein Vergleich der Einzelwerte zwischen Mutter und Embryo ließ jedoch keine Abhängigkeit erkennen. Eine operationsbedingte Erhöhung des Glukosegehaltes in der Dottersackflüssigkeit konnte aber nicht ausgeschlossen werden.

Bei der Betrachtung der Ergebnisse von *Lutwak-Mann (1962)* muß beachtet werden, daß die Art der Probengewinnung nicht beschrieben wurde und somit die Möglichkeit besteht, daß die Autorin die Bestimmungen in der Dottersackflüssigkeit erst nach Tötung der Muttertiere durchgeführt hat. Dann wäre aber, wegen der sofort einsetzenden anaeroben Glykolyse eine Verschiebung des Glukosegehaltes zu Gunsten der Lactatkonzentration eingetreten. Der Unterschied zwischen mütterlichen und embryonalen Glukosewerten, der im Gegensatz zu den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit steht, wäre somit erklärbar, nimmt man als Maßstab die mütterlichen Werte vor der Operation.

Die Glukose hat zwar im embryonalen Stoffwechsel eine wesentliche Bedeutung, was sich in Kultivierungsversuchen (*Daniel, 1965*) und in ihrer Wechselwirkung mit einigen Aminosäuren (*Ihle et al., 1966; Fridhandler, 1959*) zeigte, jedoch scheint sie als Energiequelle für den Embryo nicht in Frage zu kommen (*Kirchner, 1969*).

Bis zur Implantation fand man in der Blastozyste eine niedrige Glukosekonzentration, die erst nach der Implantation anstieg (*Daniel, 1965*).

Die ansteigende Tendenz konnte bis zum 8. d.p.c. beobachtet werden (*Lutwak-Mann, 1959*).

10.3.5.2 Untersuchungen nach Applikation von CP

Die Behandlung mit CP ergab in der Dottersackflüssigkeit nur leichte Abwei-

chungen der Glukosekonzentrationen von den Kontrollwerten. Sie waren in keinem Fall signifikant.

1 Stunde nach Applikation von CP fanden sich, sowohl beim Muttertier, als auch in der Dottersackflüssigkeit, lediglich leichte Abweichungen, die nach 3, 6 und 12 Stunden nicht mehr zu beobachten waren.

Hyperglykämien wurden nach Gabe von CP von *Schmidt (1967)* beschrieben. Der Autor bestimmte die Glukose- und Lactat-Konzentrationen in den zuführenden und abführenden Gefäßen von künstlich erzeugten Tumoren bei der Ratte. Dabei fand er eine Steigerung der Glykolyse in den Tumorzellen um etwa 30%.

Beim Transport der Glukose durch die Zellmembran handelt es sich um erleichterte Diffusion. Carrier sind zwar notwendig, Energie wird jedoch direkt, im Gegensatz zum aktiven Transport, nicht verbraucht. Ferner ist der Durchtritt der Glukose durch die Zellmembran unter anderem vom Natriumgefälle zwischen extra- und intrazellulärem Raum abhängig. Es vollzieht sich ein Berg-auf-Transport von Glukose, wenn das Natriumgefälle entgegengesetzt gerichtet ist (*Rapoport, 1973*).

Somit ist die Glukoseaufnahme indirekt doch energieabhängig, weil der Natrium-Transport Energie benötigt.

In der vorliegenden Arbeit konnte jedoch in der Dottersackflüssigkeit weder eine Veränderung des Natriumgehaltes, noch der Glukosekonzentration nachgewiesen werden. Der Glukosetransport schien somit durch CP oder einen Metaboliten keine nachweisbare Veränderung zu erfahren.

Änderungen der Glukosekonzentration in der Amnionhöhle des Kaninchens können, zumindest am 14. d.p.c., embryotoxisch und teratogen wirken (*Clavert und Wolff-Quenot, 1972*).

10.3.6 Lactat

10.3.6.1 Normalwerte

Die Lactatkonzentrationen in der Dottersackflüssigkeit lagen im Versuch III/N (Normalwerte) mit durchschnittlich 66 mg/100 ml weit über den mütterlichen Werten.

Die von *Lutwak-Mann (1962)* und *Hafez und Sugawara (1968)* ebenfalls beim Kaninchen am 9. d.p.c. bestimmten Lactatwerte der Dottersackflüssigkeit stimmten mit den eigenen Ergebnissen überein.

Es ist bekannt, daß der Lactatgehalt im Genitaltrakt des Kaninchens kurz vor der Ovulation ansteigt (*Homdahl und Mastroianni, 1965*) und noch bis zum 3. d.p.c. im Eileiter stark erhöht ist (*Mastroianni und Wallach, 1961*). Außerdem zeigte sich bei Kultivierungsversuchen, daß hohe Lactatkonzentrationen das Blastozystenwachstum stimulieren konnten (*Daniel, 1965*).

Ob die Erhöhung dieses Metaboliten eine bestimmte Funktion in der embryonalen Entwicklung (eventuell im Energiestoffwechsel) darstellt, oder ob Lactat nur auf Grund einer verstärkten anaeroben Glykolyse entsteht, ist nicht bekannt.

10.3.6.2 Veränderungen nach Applikation von CP

Nach der Behandlung mit CP ergaben sich zwar gegenüber der Kontrolle leichte Verschiebungen, besonders in der Dottersackflüssigkeit nach 3 und 12 Stunden, die einzelnen Mittelwerte wichen jedoch nicht entscheidend von den Normalwerten ab.

Insgesamt zeigte auch die Dottersackflüssigkeit der Kontrolltiere aus ungeklärten Gründen etwas erniedrigte Werte im Vergleich zu den im Versuch III/N gemessenen Konzentrationen. Die Streuung der Einzelwerte war bei den mit CP-behandelten Tieren leicht erhöht, aber nur nach 3 Stunden signifikant.

Lactat ist ein sehr empfindlicher Stoffwechselparameter, der sich schon bei geringen Muskelbewegungen erhöht. Um eine sichere Aussage über das Verhalten der Lactatkonzentration treffen zu können, muß ein größerer Stichprobenumfang untersucht werden. Außerdem dürften sich für Lactatbestimmungen ruhigere Versuchstiere besser eignen, als Kaninchen.

10.3.7 Aktivität der alkalischen Phosphatasen

10.3.7.1 Normalwerte

Die Aktivität der alkalischen Phosphatasen in der Dottersackflüssigkeit lag im Versuch III/N (Normalwerte) bei durchschnittlich 54 U/l.

Die im mütterlichen Serum gemessenen Werte waren mit 22 U/l (vor der Operation) und 24 U/l (während der Operation) deutlich geringer.

Bestimmungen der alkalischen Phosphatasen wurden für den 9. d.p.c. beim Kaninchen in der Literatur bisher nicht beschrieben.

Die alkalischen Phosphatasen bestehen beim Menschen aus einer Mischung von Isoenzymen, die noch nicht eindeutig definiert sind. Die Blutkonzentration spiegelt aber, mit Ausnahme bei Leber- und Gallenwegserkrankungen, die Phosphataseaktivität des wachsenden Knochens (z.B. auch nach Frakturen und Knochenmetastasen) wider (*Huhnstock und Kutscha, 1976*).

Einen Anstieg der alkalischen Phosphatasen findet man aber nicht nur bei Erkrankungen, sondern auch in der Kindheit und während der Schwangerschaft (*Hebold und Czerwek, 1972*).

Die gegenüber dem Muttertier erhöhte Aktivität in der Dottersackflüssigkeit hängt wahrscheinlich nicht mit einer verstärkten Osteoblastentätigkeit des embryonalen Skelettsystems zusammen, da zu diesem Zeitpunkt die Knochen noch nicht entwickelt sind. Die Aktivität der Knochenphosphatase erhöht sich erst zum Zeitpunkt der Verknöcherung (*Rapoport, 1973*).

Die alkalischen Phosphatasen spielen jedoch bei Transportvorgängen in der Zellmembran eine Rolle (*Bielka, 1973*), indem sie Phosphatester vor der Membranpassage spalten.

Weiterhin sind für den Nukleotidabbau alkalische Phosphatasen notwendig (*Rapoport, 1973; Bielka, 1973*).

Welche Funktionen die alkalischen Phosphatasen in diesem embryonalen Stadium erfüllen, ist bisher unklar. Es könnte sich hierbei um einen verstärkten Bedarf an Phosphat, bzw. phosphathaltigen Grundbausteinen handeln, die nach ihrer Spaltung zu neuen, für den Embryo wichtigen Substanzen aufgebaut werden.

Lutwak-Mann (1954) konnte bei 6 Tage alten Kaninchenblastozysten kein Phosphat nachweisen. Am 10. d.p.c. stieg der Phosphatgehalt dann aber auf die Hälfte der mütterlichen Konzentration an.

10.3.7.2 Veränderungen nach Applikation von CP

Die Behandlung mit CP verursachte im Keimanlagenmaterial keine wesentlichen Verschiebungen der Mittelwerte gegenüber der Kontrolle. Auffällig waren jedoch die größeren Schwankungen der Einzelwerte, besonders nach 1 Stunde in der Dottersackflüssigkeit und nach 6 Stunden in der Dottersackflüssigkeit und im mütterlichen Serum.

Es mußte angenommen werden, daß solche Abweichungen auf eine unterschiedliche Schädigung einzelner Keime beruhte. *v.Kreybig (1965 b)* diskutierte bereits einen "Alles-oder-Nichts Effekt" des CP auf den Embryo der Ratte.

In der vorliegenden Arbeit konnte nicht differenziert werden, um welches Isoenzym der alkalischen Phosphatasen es sich in der Dottersackflüssigkeit handelte, so daß über die nach CP-Gabe beobachteten Aktivitätsänderungen im Keimanlagenmaterial nur Vermutungen geäußert werden können.

Es wäre durchaus denkbar, daß durch Zelluntergang vermehrt alkalische Phosphatase in den extrazellulären Raum gelangt ist. Dieser Vorgang ist bei bestimmten Lebererkrankungen bekannt. Keimanlagen mit einer hohen Aktivität hätten somit eine erhöhte Zelluntergangsrate und würden wahrscheinlich später als Resorption imponieren.

Der Zusammenhang zwischen einer erhöhten alkalischen Phosphataseaktivität in der Dottersackflüssigkeit und vermehrtem embryonalen Zelltod nach CP-Gabe, wurde durch den Umstand erhärtet, daß Keimanlagen mit extrem hoher Aktivität, auch erhöhte Kalium-Werte aufwiesen. Siehe hierzu im Tabellenanhang Versuch III/CP₁ (Tier Nr. 43 und 46), Versuch III/CP₆ (Tier Nr. 2 und 8) und Versuch III/CP₁₂ (Tier Nr. 6). In der Kontrolle zeigte sich dies nur bei einem Tier (Versuch III/NaCl₁₂, Tier Nr. 64).

Ein möglicher Zusammenhang zwischen einer Kaliumerhöhung und embryonalem Zelluntergang wurde bereits in Kapitel 10.3.2.2 diskutiert.

Neben einer durch Zelltod verursachten Veränderung der alkalischen Phosphataseaktivität konnte andererseits eine reaktive Erhöhung, auf Grund eines vermehrten Bedarfes an Phosphat, bzw. phosphathaltigen Substanzen nicht ausgeschlossen werden.

10.3.8 Freie Aminosäuren

10.3.8.1 Normalwerte

In der Literatur wurden keine Angaben über den Gehalt an freien AS in der Dottersackflüssigkeit gefunden.

Die Bestimmung der Normalwerte ergab (Versuch III/N), daß die AS-Gesamtkonzentration im Keimanlagenmaterial mit 113,0 mg/100 ml fast doppelt so hoch war, wie im mütterlichen Plasma (62,7 mg/100 ml). Dies mußte auf den vermehrten Gehalt an sauren und neutralen AS, vor allen Dingen auf Gly, Ala, Ser, Pro, Thr, Asn/Gln, Asp, Glu, Phe und Tyr zurückgeführt werden.

Bis auf Phe und Tyr sind dies relativ kurzkettige AS mit einem Molekulargewicht (MG) unter 146 (siehe Tabelle 46).

AS mit höheren MG waren im Dottersack gegenüber dem mütterlichen Plasma nicht signifikant erhöht.

Die kurzkettigen AS (besonders Gly, Ala, Ser und Thr) scheinen für die Embryonalentwicklung von besonderer Bedeutung zu sein (*Fridhandler, 1959; Armstrong und Yates, 1964; Daniel, 1965; Ihler et al., 1966; Daniel und Krishnan, 1967*). Daneben konnte aber, sowohl bei der Maus, als auch beim Kaninchen in vitro gezeigt werden, daß auch langkettige AS, wie zum Beispiel Arg, sowie nicht aliphatische AS, wie His, eine für das embryonale Wachstum essentielle Bedeutung haben (*Gwatkin, 1966; Daniel und Krishnan, 1967*).

Bezüglich einer wachstumsfördernden Wirkung von Lys, Phe, Tyr und Met bei Kultivierungsversuchen, scheint es aber zwischen den beiden Species grundsätzliche Unterschiede zu geben (siehe auch Absatz 6.6, Seite 24).

Über die speziellen Aufgaben der einzelnen AS während der Embryonalentwicklung ist noch wenig bekannt.

Während die Synthese spezifischer Proteine diskutiert wurde (*Daniel und Krishnan, 1967; Kirchner, 1969*), und man den freien AS eine Kontrollfunktion über die Implantation zuschrieb (*Gwatkin, 1966*), wurden auch gewisse Zusammenhänge zwischen AS und der endogenen Atmung des Embryos (*Ihler et al., 1966*) und beim Energiestoffwechsel (*Kirchner, 1969*) vermutet.

Die Keimanlage der Maus ist in der Lage, AS zu konzentrieren (*Borland und*

Tasca, 1975). Diese Beobachtung traf auch, wie die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigten, für den Kaninchenembryo zu.

Der Konzentrationsquotient der AS-Gesamtkonzentration zwischen Dottersack und mütterlichem Plasma lag im Versuch III/N bei 1,8, für einige AS höher, z.B.: 4,9 (Asp), 4,4 (Ala), 3,3 (Glu), 3,0 (Ser), 2,4 (Gly) und 2,1 (Thr).

Name der AS	Symbol	Molekulargewicht
Glycin	Gly	75
Alanin	Ala	89
Serin	Ser	105
Prolin	Pro	115
Valin	Val	117
Threonin	Thr	119
Cystein	Cys	120
(Taurin	Tau	125)
Isoleucin	Ileu	131
Leucin	Leu	131
Ornithin	Orn	132
Asparagin	Asp-NH ₂ (Asn)	132
Asparaginsäure	Asp	133
Lysin	Lys	146
Glutamin	Glu-NH ₂ (Gln)	146
Glutaminsäure	Glu	147
Methionin	Met	149
Histidin	His	155
Phenylalanin	Phe	165
1-Methylhistidin	1-MHis	169
3-Methylhistidin	3-MHis	169
Arginin	Arg	174
Citrullin	Cit	175
Tyrosin	Tyr	181
Cystathionin	Cystathio	222

Tabelle 46 - Die in der vorliegenden Arbeit bestimmten Aminosäuren sind entsprechend ihrem MG geordnet

Zieht man die entscheidenden Aufgaben von Glu, Asp und Gly in der Purin- und Pyrimidin-Synthese, also die Bedeutung dieser AS in der DNS und RNS Bildung in Betracht, so sind erhöhte Konzentrationen, gerade in prolife-

rierenden Geweben erklärbar.

Weiterhin haben die AS Thr, Ser, Gly und Asp einen entscheidenden Anteil bei der Lipo- und Glykoproteinsynthese (*Rapoport, 1973*). Während im Uterussekret von tragenden Kaninchen (6. d.p.c.) auch Glykoproteine nachgewiesen werden konnten, scheinen Lipoproteine zumindest im Genitaltrakt der Weibchen nicht vorhanden zu sein (*Kirchner, 1969*). Diese Beobachtung sagt jedoch nichts darüber aus, ob Lipoproteine auch im Keimanlagenmaterial fehlen.

Die bisher vorliegenden Erkenntnisse zeigen, daß den AS wegen ihrer zentralen Bedeutung in der Eiweiß- und Nukleotidsynthese, gerade in der embryonalen Entwicklung eine entscheidende Rolle zugeschrieben werden muß.

Die Ergebnisse der Untersuchungen von *Kirchner (1969)* deuten ferner darauf hin, daß die AS mit niedrigem MG, oder einer einfachen Molekularstruktur, für die Keimanlage des Kaninchens zu diesem Schwangerschaftszeitpunkt (9. d.p.c.) äußerst wichtig sind.

Der relative Stickstoffanteil der kurzkettigen AS ist auf das MG bezogen, hoch. Sie sind für den Embryo ein ergiebiger Stickstofflieferant. Der Gesamt-N-Gehalt steigt zwischen dem 6. und 8. d.p.c. stark an. Am Ende des 8. Tages der Gestation liegt er dann schon halb so hoch, wie im mütterlichen Serum (*Iutwak-Mann, 1959*).

10.3.8.2 Veränderungen nach CP

6 und 12 Stunden nach Applikation von CP fand sich gegenüber der Kontrolle eine Verringerung der AS-Gesamtkonzentration in der Dottersackflüssigkeit, die jedoch nicht signifikant war. Während nach 3 Stunden, sowohl die sauren und neutralen, als auch die basischen AS niedriger als die Kontrollwerte lagen, waren nach 6 Stunden nur die sauren und neutralen AS (geringeres MG !) verringert. Die basischen AS lagen in ihrer Konzentration höher, als die Kontrollwerte.

Nach *Rapoport (1973)* ist die Aufnahme von AS in die Zelle auch von der sterischen Konfiguration und den Bau des Moleküls abhängig. Verschiedene AS können mit anderen konkurrieren, wobei die Aufnahme einer AS durch den Überschuß einer anderen beeinträchtigt werden kann. Außerdem spiegelt die Konzentration der freien AS das Gleichgewicht der Auf- und Abbauvorgänge von Proteinen wider; bei mangelnder Eiweißzufuhr, oder einem Überwiegen anaboler Prozesse, ist ein Abfall der AS zu beobachten.

6 Stunden nach Applikation von CP fand sich im mütterlichen Plasma eine signifikant erniedrigte AS-Konzentration und eine Erhöhung des Eiweißgehaltes. Möglicherweise bestand hier ein Zusammenhang.

In der Dottersackflüssigkeit blieb bei verminderter AS-Konzentration der Gesamteiweißgehalt nahezu gleich.

Die AS-Aufnahme in die Keimanlage scheint *in vitro* nicht von der Konzentration der Umgebung, sondern vom Entwicklungsstand des Embryos abhängig zu sein (*Weitlauf und Greenwald, 1967*).

Die hohen Konzentrationsunterschiede zwischen Dottersackflüssigkeit und mütterlichem Plasma ließen dies auch für den Kaninchenembryo *in vivo* am 9. d.p.c. vermuten.

Die mittleren AS-Gesamtkonzentrationen in den Keimanlagen fielen 3 und 6 Stunden nach CP-Behandlung zwar ab, das Verhältnis zwischen Dottersackmaterial und mütterlichem Plasma war jedoch gegenüber der Kontrolle erhöht. Es zeigte sich weiterhin, daß 6 Stunden nach CP-Gabe bei den AS Cys und Met und 12 Stunden nach Applikation bei den AS Cys, Leu und Tyr, im Vergleich zur entsprechenden Kontrolle, eine Umkehr des Konzentrationsgefälles zwischen Embryo und Mutter auftrat.

Bei den meisten AS stieg der Konzentrationsquotient (DS/Mutter) jedoch nach Gabe von CP an, was vermutlich an dem starken Abfall der mütterlichen Konzentrationen lag.

AS werden grundsätzlich über aktive Mechanismen in die Zelle geschläußt. Dabei zeigen die sauren, neutralen und basischen AS ein unterschiedliches Verhalten, so daß angenommen werden muß, daß hierbei verschiedene Systeme (Carrier) wirksam sind. Der AS-Transport ist weiterhin vom Kalium-Gehalt der Zelle abhängig. Stoffe, die zum Beispiel die Kaliumkonzentration vermindern, hemmen den AS-Transport. (*Rapoport, 1973*)

Die verringerte AS-Konzentration in der Dottersackflüssigkeit nach Gabe von CP muß entweder auf einen verstärkten Eiweißaufbau, eine mangelhafte Zufuhr (eventuell durch Störungen des Transportsystems), oder auf einen erschöpften AS-Pool (vielleicht durch Synthesehemmung) zurückgeführt werden. Bei einem verstärkten Metabolismus müßte jedoch auch der Proteingehalt der Keimanlage ansteigen. Dies konnte nicht beobachtet werden, so daß diese Begründung vermutlich nicht herangezogen werden kann.

Die AS-Gesamtkonzentration im mütterlichen Plasma war ebenfalls vermindert. Es liegt die Vermutung nahe, daß die niedrige embryonale Konzentration eine direkte Folge des mütterlichen Mangels darstellte.

Jedoch müssen auch Behinderungen des AS-Transportsystems diskutiert werden, denn nicht bei allen AS, die im mütterlichen Plasma verringert waren, fand man auch einen Konzentrationsabfall in der Dottersackflüssigkeit. Bei einigen AS wurde sogar nach Gabe von CP eine Umkehr des Konzentrationsgefälles zwischen Embryo und Muttertier beobachtet (siehe oben).

Bei der entscheidenden Rolle, die freie AS gerade im embryonalen Keimanlagenmaterial spielen, müssen Änderungen in der Konzentration als Ursache für Fehlbildungen und Resorptionen diskutiert werden.

Daniel und Krishnan (1967) konnten zeigen, daß eine Verringerung von essentiellen-, oder auch das völlige Fehlen von nicht essentiellen AS beim Kaninchen in vitro, zumindest zu einer Wachstumsretardierung führte.

10.4 Zusammenfassende Diskussion

Für die embryotoxische und teratogene Wirkung von CP kommen theoretisch verschiedene Mechanismen in Betracht:

1. CP dringt bis zum Embryo vor und hat dort selbst, als unveränderte Substanz, eine schädigende Wirkung.

Nach bisher vorliegenden Erkenntnissen hat CP in vitro nur sehr geringe zytotoxische Wirkungen (*Connors et al.*, 1974) und zeigte nach direkter Applikation in die Dottersackflüssigkeit am 9. d.p.c. beim Kaninchen keine erhöhte embryotoxische Wirkung. Dies galt auch für hohe Dosen von 320 µg/Keimanlage (*Krengel, Diss. in Vorbereitung*); diese Dosis entspräche nach Umrechnung etwa 320 mg/kg KG.

Außerdem handelte es sich bei den beobachteten Fehlbildungen (siehe Versuchsserie I dieser Arbeit) vermutlich um rein phasenspezifische und nicht um substanzspezifische Schädigungen. In der Kontrolle, hier allerdings nicht so häufig, wurde das gleiche Mißbildungsspektrum wie nach Gabe von CP beobachtet. Bei einer Schädigung durch CP selber, im Sinne einer direkten lokalen Einwirkung auf bestimmte embryonale Strukturen, wäre ein spezifisches Mißbildungsspektrum wahrscheinlich gewesen. Auch *Gottschewski und Zimmermann* (1963) fanden beim Kaninchen zwischen dem 6. und 9. d.p.c. nach Applikation von CP nur phasenspezifische Wirkungen. Erst nach Gabe des Medikamentes am 13. d.p.c. konnte *v. Kreybig* (1966) ein substanzspezifisches Mißbildungssyndrom bei der Ratte erzeugen. Zu diesem Zeitpunkt ist der embryonale Kreislauf bereits an das mütterliche Blut angeschlossen (hämatotrophe Phase).

Eine Schädigung der embryonalen Strukturen am 9. d.p.c. beim Kaninchen wird nach mütterlicher Gabe von CP somit wahrscheinlich nicht durch die Substanz selber verursacht.

2. Acrolein, ein hoch toxischer Aldehyd und Metabolit von CP, dringt bis zum Embryo vor und ist für die Fehlbildungen und Resorptionen verantwortlich.

Diese Vermutung muß als ein möglicher embryotoxischer Wirkmechanismus von CP diskutiert werden. Acrolein war nach Testung mit der Dottersackmethode (direkte Applikation in den Dottersack am 9. d.p.c. beim Kaninchen) und nach intravenöser Gabe beim Muttertier zum gleichen Schwangerschaftszeitpunkt embryo-

letal und teratogen (*Pache, Diss. in Vorbereitung*). Das Mißbildungsspektrum wies nach i.v. Applikation und nach Injektion in den Dottersack, ähnlich wie nach Gabe von CP selber, keine spezifischen Fehlbildungen auf. Weiterhin konnte Acrolein nach i.v. Gabe von CP beim Muttertier in der Dottersackflüssigkeit nachgewiesen werden (*Krengel, Diss. in Vorbereitung*).

3. Andere, noch nicht bekannte Metabolite, dringen bis zum Embryo vor und sind embryotoxisch wirksam.

Bei dünnschichtchromatographischen und fluorimetrischen Untersuchungen konnten bisher nach i.v. Gabe von CP beim Muttertier nur Acrolein als Metabolit und CP als unveränderte Substanz in der Dottersackflüssigkeit nachgewiesen werden (*Krengel, Diss. in Vorbereitung*). Es ist jedoch zur Zeit nicht ausgeschlossen, daß mit anderen Bestimmungsmethoden weitere Metabolite von CP in der Dottersackflüssigkeit nachgewiesen werden können.

4. CP-Metabolite schädigen die Dottersackwand derart, daß bestimmte Austausch- und Ernährungsfunktionen beeinträchtigt werden, was zur Keimschädigung führt.

Die Funktionen der Dottersackwand sind noch nicht hinreichend bekannt. Es liegt jedoch nahe, daß auch die Dottersackwand gewisse Ähnlichkeiten mit einer Zellmembran hat. Dafür sprechen verschiedene, zellmembranähnliche Strukturen und Funktionen, die bisher elektronenmikroskopisch und biochemisch nachgewiesen werden konnten (*Johnson und Spinuzzi, 1966; Sonoda et al., 1973; Jansen et al., 1975*).

Es ist denkbar, daß Eingriffe in das komplexe Transportsystem, wo neben der freien Diffusion und der erleichterten Diffusion auch aktive Mechanismen eine Rolle spielen (*Nishimura und Tanimura, 1976*), zu quantitativen Veränderungen in der Zusammensetzung des Keimanlagenmaterials führen.

Wie in der vorliegenden Arbeit beschrieben, veränderte sich die Zusammensetzung des Keimanlagenmaterials nach Gabe einer embryotoxischen Dosis von CP (= 80 mg CP/kg KG) beim Kaninchen am 9. d.p.c. Abweichungen von der Norm (Versuch III/N = Normalwerte) fanden sich, allerdings nicht so häufig, auch in den Kontrollversuchen. Da sich auch in Versuchsserie I das Mißbildungsspektrum bei den Kontrolltieren nur quantitativ vom Mißbildungsspektrum der CP-behandelten Tiere abwich, kann ein Zusammenhang zwischen der Embryotoxizität von CP und Veränderungen in der Zusammensetzung der Dottersackflüssigkeit vermutet werden.

In Übereinstimmung mit den Ergebnissen von *Krengel (Diss. in Vorbereitung)*, der nach mütterlicher Gabe von 80 mg CP/kg KG einen zweimaligen Konzentra-

tionsanstieg aktiver Metabolite im Serum nachweisen konnte (1 und 3 Stunden nach Applikation), wurden die Veränderungen in der Zusammensetzung der Dottersackflüssigkeit mit einer geringen zeitlichen Verzögerung hauptsächlich nach 3 und 6 Stunden beobachtet. Nach 12 Stunden normalisierten sich die Werte wieder (*Krengel* konnte nach 12 Stunden keine Metabolite mehr im mütterlichen Blut nachweisen). Dies läßt darauf schließen, daß die Dottersackwand zu diesem Zeitpunkt wieder normal arbeitet. Vermutlich waren die Keime nach 12 Stunden bereits abgestorben, oder hatten die CP-Exposition mit leichten Fehlbildungen, oder ohne Schädigungen, nur mit Retardierungszeichen überlebt. Alle lebenden Neugeborenen zeigten nach mütterlicher Behandlung mit 80 mg CP/kg KG Retardierungszeichen (Verringerung des Gewichtes und der Scheitelsteißlänge). Dagegen waren die Jungtiere einiger Häsinnen ohne erkennbare Fehlbildungen, andere Neugeborene jedoch stärker mißgebildet. Bei einigen Würfen waren alle Keimanlagen resorbiert. Diese unterschiedlichen Schweregrade der embryonalen Schädigung müssen auf individuelle Unterschiede im Stoffwechselverhalten und in der Reaktion auf exogene Reize zurückgeführt werden. Auch die Konzentration verschiedener Nährstoffe, die für die embryonale Entwicklung von Bedeutung sind, können innerhalb einer Species von Weibchen zu Weibchen stark variieren (*Hafez und Sugawara, 1968*).

Die in der vorliegenden Arbeit angewandte Methodik gab keinen Aufschluß, wie die beobachteten Veränderungen zustande kamen. Über entsprechende Mechanismen kann somit nur diskutiert werden. Im Vordergrund stehen wohl die zum Teil signifikanten Konzentrationsabfälle der freien Aminosäuren. Hier wurden durch CP sicherlich bestimmte Dottersackfunktionen beeinträchtigt. Auch bei den Elektrolyten kam es zu auffälligen Veränderungen gegenüber der Kontrolle, die eindeutig als CP-bedingte Störungen angesehen werden müssen.

In diesem Zusammenhang sei auf die hohen Schwankungen der alkalischen Phosphatase-Aktivitäten hingewiesen, die vor allen Dingen nach Applikation von CP auftraten. Gerade diese Enzymgruppe hat bekanntermaßen entscheidende Aufgaben bei Zellmembranfunktionen (z.B. Spaltung von Phosphatestern vor der Zellmembranpassage).

Der Verdacht, daß das embryotoxische Wirkprinzip von CP auch über eine Beeinflussung der Dottersackfunktion zu stande kommt, konnte durch die Ergebnisse dieser Arbeit erhärtet werden.

5. Der Stoffwechsel des Muttertieres wird durch die Wirkung von CP, bzw. seiner Metabolite, geschädigt, so daß es sekundär zum embryonalen Tod und zu Fehlbildungen kommt.

Eine Beeinflussung des mütterlichen Stoffwechsels wurde nach CP-Applikation ebenfalls bei einigen Parametern beobachtet. Jedoch zeigte sich auch, daß die Zusammensetzung der Dottersackflüssigkeit sehr konstant und zum Teil sogar unabhängig von Veränderungen im mütterlichen Blut war.

Eine embryotoxische Wirkung auf Grund von Stoffwechseländerungen beim Muttertier, muß zwar diskutiert werden, schien aber in diesem Fall nicht wesentlich und alleine für die Schädigung des Embryos verantwortlich zu sein.

6. Es existiert ein komplexes Zusammenspiel von mehreren der oben genannten Mechanismen, welches für die beobachteten Wirkungen am Embryo verantwortlich ist.

Ein Zytostatikum wie Cyclophosphamid, welches über komplizierte Abbauvorgänge metabolisiert wird und eine Anzahl von zum Teil noch nicht näher bekannten Metaboliten besitzt, hat verschiedene Angriffspunkte im mütterlichen und embryonalen Stoffwechsels. Von den theoretischen in Frage kommenden Wirkmechanismen können bis auf Punkt 1 alle genannten Punkte in Betracht gezogen werden.

Allerdings müssen die Wirkung von Acrolein am Embryo und die Beeinträchtigung der Dottersackfunktionen durch CP-Metabolite besonders hervorgehoben werden. Es kann nicht ausgeschlossen werden, daß das embryotoxische Wirkprinzip von CP durch ein komplexes Zusammenspiel gerade dieser beiden Mechanismen zu stande kommt.

11. ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob eine embryotoxische Dosis von CP nach intra-venöser Applikation beim Muttertier in der Lage ist, beim Kaninchen (weiße Neuseeländerinnen) am 9. d.p.c. die Zusammensetzung der Dottersackflüssigkeit zu verändern.

Zur Klärung dieser Frage wurden drei Versuchsserien durchgeführt:

In VERSUCHSSERIE I (teratologische Untersuchungen nach Gabe von CP) wurden drei verschiedene Dosen CP (20-, 40- und 80 mg CP/kg Körpergewicht dem Muttertier am 9. d.p.c. i.v. appliziert. In der Kontrolle verabreichte man nur das Lösungsmittel (= physiologische NaCl-Lösung).

Die Zahl der mißgebildeten Feten und die Zahl der Resorptionen war nach Gabe von CP in allen drei Dosen gegenüber der Kontrolle erhöht. Bei der 80 mg-Dosis war die Resorptionsrate mit 83,3% auch gegenüber den anderen Dosen signifikant erhöht. Die aufgetretenen Mißbildungen waren phasen-, aber nicht substanzspezifisch; sie konnten auch in der Kontrolle, allerdings nicht so häufig, beobachtet werden.

Die Ergebnisse werden an Hand einer Literaturübersicht mit den bisher vorliegenden Arbeiten über teratogene und embryotoxische Wirkungen von CP verglichen. Für die weiteren Untersuchungen (Versuchsserie III) wurde die Dosis von 80 mg CP/kg KG gewählt.

In VERSUCHSSERIE II wurden verschiedene Methoden, der in Versuchsserie III zur Anwendung gekommenen Äther-Narkose auf ihre stoffwechselbeeinflussende Wirkung untersucht. Als Parameter für die Stoffwechsellage bestimmte man den pH und die Partialdrucke der Blutgase CO_2 und O_2 .

Es zeigte sich, daß unter Anwendung eines Äther-Preßluftgemisches, welches zunächst schnell anfluten mußte, bis die Tiere keine Reflexe mehr zeigten, recht konstante pO_2 -Werte erzielt werden konnten. Nach Verkleinerung des Totraumes durch Intubation, konnte die Äther-Konzentration in der Atemluft vermindert werden. Dies führte zu nur geringen Abweichungen der pH-Werte und der CO_2 - und O_2 -Partialdrucke. Diese Narkosemethode wurde in Versuchsserie III angewandt. Es werden die in der Literatur beschriebenen Ätherbedingten Stoffwechselveränderungen diskutiert. Es bestehen keine Hinweise auf eine teratogene Wirkung des Äthers auf den Kaninchenembryo.

In VERSUCHSSERIE III wurde das mütterliche Blut und die Dottersackflüssigkeit untersucht. Neben Normalwerten bestimmte man verschiedene Parameter nach Applikation von CP (80 mg CP/kg Körpergewicht), in den Zeitabständen von 1, 3, 6 und 12 Stunden nach der Behandlung. Zu den gleichen Zeitpunkten wurden auch die Kontrolltiere untersucht.

Folgende Parameter wurden gemessen: pH, $p\text{CO}_2$, $p\text{O}_2$, Natrium, Kalium, Calcium, Gesamteiweiß, Glukose, Lactat, alkalische Phosphatasen und freie Aminosäuren.

Es zeigten sich nach Gabe von CP Veränderungen in der Zusammensetzung der Dottersackflüssigkeit und des mütterlichen Blutes, die verstärkt nach 3 und 6 Stunden auftraten. Gegenüber den Kontrolle zeigten sich Abweichungen im Säure-Basen-Haushalt, im Sauerstoffpartialdruck und in der Konzentration verschiedener Elektrolyte. Außerdem wurde die Konzentration einzelner Aminosäuren, sowie das Konzentrationsgefälle einiger Aminosäuren zwischen Muttertier und Embryo durch CP beeinflusst.

Schwerwiegende Veränderungen der Gesamteiweiß- und Glukosekonzentrationen konnten mit den hier aufgezeigten Methoden nicht nachgewiesen werden.

Bei den Aktivitäten der alkalischen Phosphatasen zeigten sich ebenfalls keine Veränderungen der Mittelwerte gegenüber den Kontrolle, sondern eine größere individuelle Streuung der Einzelwerte.

Neben der CP-bedingten Veränderungen in der Zusammensetzung der Dottersackflüssigkeit werden auch andere Mechanismen als Ursache für die embryotoxische Wirkung von CP diskutiert.

A N H A N G

TABELLEN - ABBILDUNGEN
zu Versuchsserie III

Nr.	pH			pCO ₂ (mmHg)			pO ₂ (mmHg)			L-Lactat (mg/100ml)		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
V E R S U C H III/N												
12	7,31	7,35	6,90	44,0	32,6	67,5	95	110	98	11	40	39
14	7,15	7,28	7,07	36,0	26,3	57,5	124	107	105	40	23	43
17	7,26	7,16	6,83	48,0	35,7	95,1	81	134	106	20	43	51
19	7,27	7,39	7,13	34,1	30,7	37,9	86	89	133	20	18	63
20	7,37	7,30	6,84	39,1	31,2	84,5	102	124	110	26	40	43
21	7,28	7,27	7,01	43,7	41,5	63,3	101	125	95	16	32	46
23	7,33	7,23	7,19	26,3	22,1	31,6	100	87	91	27	47	76
24	7,28	7,32	7,07	23,8	19,9	35,0	103	126	126	24	33	54
25	7,22	7,39	7,20	34,6	30,4	36,8	91	106	121	29	41	51
27	7,31	7,38	7,23	25,9	19,4	37,0	90	83	101	32	26	59
28	7,23	7,41	7,13	44,2	18,1	54,8	105	145	132	35	22	89
30	7,31	7,22	7,12	36,1	39,5	48,7	115	175	135	19	24	69
36	7,28	7,46	7,13	29,2	25,7	50,8	115	163	123	24	30	76
37	7,26	7,32	6,96	35,3	33,8	83,4	102	76	135	37	27	69
62	7,20	6,93	6,99	43,1	88,0	58,2	98	139	118	38	55	119
63	7,27	7,13	7,31	41,4	33,4	57,5	115	157	95	37	42	75
100	7,27	7,19	6,92	46,3	30,1	85,8	129	168	112	27	36	42
101	7,25	7,27	7,05	42,1	34,2	57,8	116	148	130	27	29	43
103	7,26	7,20	7,13	45,8	34,0	62,3	95	132	102	32	36	43
141	7,13	7,13	6,82	42,0	36,1	43,0	129	71	122	23	64	159
$\bar{x}$	7,26	7,27	7,05	38,1	33,1	57,6	105	123	115	27	35	66
$\pm s_x$	0,06	0,12	0,14	7,3	14,5	18,4	14	31	15	8	12	30

V E R S U C H III/NaCl ₁												
13	7,21	7,20	6,91	38,9	42,5	99,5	127	108	104	35	44	49
47	7,26	7,26	7,10	41,0	26,1	86,5	120	132	120	28	39	51
51	7,25	7,26	7,09	42,2	28,9	60,8	90	112	112	14	36	49
52	7,25	7,29	6,87	44,2	35,0	87,3	95	110	119	27	33	55
53	7,21	7,15	7,06	40,7	28,2	50,7	94	95	121	31	51	49
57	7,18	7,06	6,89	29,3	30,0	78,1	109	129	105	18	51	48
$\bar{x}$	7,23	7,20	6,99	39,9	31,8	77,1	106	114	114	26	42	50
$\pm s_x$	0,03	0,09	0,11	5,2	6,0	18,1	13	14	8	8	8	3

V E R S U C H III/CP ₁												
11	7,23	7,34	7,05	30,0	18,6	61,7	133	130	136	17	30	51
42	7,25	7,27	7,16	67,5	37,8	88,5	103	127	120	24	27	44
43	7,27	7,38	7,13	62,0	30,0	122,5	118	123	125	18	37	44
44	7,23	6,93	7,08	66,1	28,0	109,2	107	180	115	14	57	44
46	7,30	7,23	7,09	53,9	34,2	107,8	91	103	129	15	41	42
48	7,30	7,39	7,10	56,0	25,0	97,7	98	161	122	18	39	43
$\bar{x}$	7,26	7,26	7,10	55,9	28,9	98,0	108	137	125	18	39	45
$\pm s_x$	0,03	0,17	0,04	13,8	6,8	21,1	15	28	7	4	11	3

Nr.	pH			pCO ₂			PO ₂			L-Lactat		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
VERSUCH III/NaCl ₁												
16	7,22	7,20	6,63	32,4	26,7	142,5	105	127	121	45	55	51
22	7,37	7,17	6,92	35,9	26,1	96,0	101	136	122	35	46	41
45	7,26	7,15	6,95	54,5	28,7	121,9	122	144	120	15	52	46
54	7,25	7,29	6,79	48,4	32,6	142,2	101	73	108	25	38	59
58	7,15	7,18	7,00	42,3	37,6	174,8	94	99	112	41	44	54
71	7,27	7,34	6,92	38,0	32,2	71,0	115	104	101	18	29	43
$\bar{x}$	7,25	7,22	6,87	41,9	30,7	124,8	106	114	114	30	44	49
$\pm s_x$	0,07	0,08	0,14	8,3	4,4	37,1	10	27	9	12	10	7
VERSUCH III/CP ₃												
26	7,22	6,98	6,83	39,9	38,6	90,5	116	202	126	27	55	48
50	7,24	7,02	6,88	41,7	44,6	96,4	122	153	107	22	65	89
105	7,25	7,22	7,03	37,9	31,9	55,0	97	129	122	9	22	35
107	7,27	7,03	7,07	48,9	27,7	52,9	122	143	97	22	56	49
108	7,29	7,19	7,03	63,0	36,6	64,8	105	121	107	34	50	53
109	7,25	7,03	7,11	32,1	24,8	66,0	109	181	101	48	58	45
$\bar{x}$	7,25	7,08	6,99	43,9	34,0	70,5	112	155	110	27	51	53
$\pm s_x$	0,02	0,10	0,11	10,8	7,3	18,3	10	31	12	13	15	19
VERSUCH III/NaCl ₆												
15	7,21	7,27	7,25	28,5	25,5	39,0	107	83	104	45	50	41
18	7,23	7,31	7,05	34,0	26,0	63,5	110	92	112	45	46	47
55	7,27	7,20	7,04	45,5	28,2	57,8	81	117	101	14	46	52
56	7,20	7,21	7,11	45,6	30,6	48,0	108	129	112	42	43	50
72	7,33	7,34	6,89	38,0	36,0	93,3	98	136	98	23	37	77
99	7,26	7,27	7,25	28,5	25,5	39,0	107	83	104	23	44	44
$\bar{x}$	7,25	7,26	7,07	37,2	29,0	57,1	101	112	105	32	44	45
$\pm s_x$	0,05	0,06	0,11	7,2	3,9	20,1	11	21	6	14	4	6
VERSUCH III/CP ₆												
1	7,29	7,32	7,20	32,7	18,5	47,5	129	147	125	39	36	47
2	7,24	7,27	6,98	33,8	26,2	76,0	118	143	147	38	42	49
3	7,28	7,35	7,06	45,0	23,5	55,0	112	72	113	18	31	46
8	7,27	7,15	7,76	34,2	26,5	96,5	98	169	137	10	31	24
106	7,22	7,15	7,13	31,5	27,8	54,6	101	134	115	37	52	48
111	7,10	7,09	7,03	29,3	22,8	52,4	108	155	154	27	37	32
$\bar{x}$	7,23	7,22	7,03	34,5	24,2	63,6	111	137	132	28	39	41
$\pm s_x$	0,07	0,11	0,15	5,5	3,4	18,9	11	34	17	12	8	10
VERSUCH III/NaCl ₁₂												
64	7,32	7,30	6,74	43,0	32,8	100,5	78	94	106	17	33	48
65	7,26	7,32	7,03	38,8	33,5	103,0	104	101	105	29	41	37
66	7,30	7,23	6,96	42,0	35,3	66,7	82	104	83	39	48	44
67	7,27	7,22	6,74	49,0	30,9	87,1	95	124	103	23	46	43
68	7,28	7,21	7,01	54,4	31,8	77,4	102	140	114	34	38	41
69	7,31	7,25	6,87	39,3	28,1	96,5	100	97	110	23	44	39
$\bar{x}$	7,29	7,26	6,89	44,4	32,1	88,5	94	110	104	28	42	42
$\pm s_x$	0,02	0,05	0,13	6,1	2,1	14,3	11	18	11	8	6	4
VERSUCH III/CP ₁₂												
4	7,24	7,22	6,90	46,0	27,6	142,5	74	138	127	23	41	59
5	7,23	7,25	6,64	42,9	24,1	196,2	100	142	131	30	41	50
6	7,17	7,21	6,94	40,8	12,6	56,1	130	139	137	17	34	60
7	7,31	7,31	6,94	21,5	18,8	69,0	85	134	111	18	34	53
9	7,24	7,18	6,96	25,9	27,1	122,5	94	169	113	26	52	44
10	7,26	7,24	6,97	44,8	25,7	120,3	110	121	113	40	39	48
$\bar{x}$	7,24	7,24	6,89	46,0	22,7	117,8	99	141	122	26	40	52
$\pm s_x$	0,05	0,04	0,13	10,5	5,9	50,9	20	16	16	9	7	6

Nr.	Na ⁺ (mval/l)			K ⁺ (mval/l)			Ca ⁺⁺ (mg/100ml)			Gesamt- eiweiss (g/100ml)			Glukose (mg/100ml)			Alk. Phosphatase (U/l)		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
	V E R S U C H III/N																	
12	134	127	131	3,7	3,2	6,2	14,2	13,9	10,9	6,3	5,7	3,7	110	155	112	13	13	22
14	136	138	145	4,2	3,7	7,8	14,2	13,9	10,2	5,5	5,5	2,9	104	137	113	14	36	145
17	137	137	135	4,8	3,4	5,6	13,3	13,5	11,2	5,7	5,7	2,9	77	115	96	24	22	106
19	140	140	139	5,7	3,2	4,8	15,6	12,8	11,0	5,0	4,7	3,4	98	156	84	22	23	36
20	131	138	134	4,4	3,9	6,3	14,2	13,7	11,2	6,3	6,1	3,9	85	134	84	12	35	44
21	134	133	131	4,9	4,6	5,6	14,6	13,8	10,7	5,1	6,3	3,7	80	106	83	37	27	37
23	138	133	140	4,8	3,5	4,2	14,7	13,3	10,9	4,1	4,3	2,9	102	165	125	26	28	87
24	140	139	138	4,9	3,2	5,4	15,3	13,2	13,0	5,1	5,1	5,1	90	150	111	16	18	16
25	139	139	136	4,3	3,3	4,3	13,9	12,4	10,2	4,4	4,5	3,8	96	184	64	20	20	44
27	135	135	132	5,0	3,1	5,2	14,4	13,3	10,4	6,0	5,1	4,9	90	181	103	32	34	35
28	131	132	140	5,7	3,4	5,4	14,9	12,7	9,7	4,6	4,5	3,7	116	167	101	32	27	113
30	140	136	135	4,0	3,4	5,0	14,8	12,5	11,3	5,5	5,2	4,1	90	158	119	17	16	36
36	135	138	134	5,7	3,8	4,7	12,4	12,0	9,7	4,6	4,3	4,1	97	121	84	25	27	60
37	143	132	135	4,3	3,9	5,0	13,5	12,0	11,3	4,2	3,7	4,0	90	106	158	36	33	71
62	137	135	139	4,6	3,7	5,5	13,4	10,6	10,9	5,8	6,1	4,4	74	152	78	24	30	58
63	140	144	135	5,0	4,3	5,0	13,9	13,2	12,1	6,0	6,3	3,4	90	122	111	26	27	29
100	140	141	131	4,5	2,7	6,6	13,4	12,3	12,0	3,8	4,9	2,9	95	188	88	12	10	27
101	142	141	140	4,1	3,3	5,1	13,6	12,5	11,2	5,1	6,0	4,7	96	164	88	16	16	57
103	137	132	136	4,2	3,7	6,9	14,5	13,2	11,3	4,8	5,3	2,1	64	144	86	17	14	24
141	137	136	138	4,3	3,4	4,6	13,4	12,3	12,3	5,9	5,9	5,7	136	174	140	14	14	33
$\bar{x}$	137	136	136	4,7	3,6	5,5	14,1	12,9	11,0	5,2	5,3	2,8	94	149	101	22	24	54
$\pm s_x$	3	4	4	0,6	0,4	0,9	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,9	16	25	23	8	8	14

V E R S U C H III/NaCl																		
13	132	135	138	3,9	3,4	5,0	12,9	12,5	10,2	5,4	4,9	3,3	88	163	93	16	11	44
47	138	139	131	4,3	4,0	4,9	13,2	12,5	10,6	4,1	4,8	3,8	76	110	129	48	47	50
51	140	136	129	4,4	4,1	4,3	13,2	12,8	11,0	5,3	5,3	3,7	86	147	101	13	13	31
52	139	139	137	3,7	3,6	5,1	13,2	12,9	11,5	5,0	5,0	3,1	110	138	112	25	25	51
53	138	136	146	4,1	4,4	5,3	14,1	14,1	11,5	5,5	5,2	4,0	85	146	71	14	22	22
57	136	136	130	3,7	3,1	5,6	13,6	12,9	10,1	5,5	4,9	2,8	54	137	75	25	29	45
$\bar{x}$	137	137	135	4,0	3,9	5,0	13,4	13,0	10,9	5,1	5,0	3,5	83	140	97	24	25	41
$\pm s_x$	3	2	7	0,3	0,5	0,4	0,4	0,4	0,6	0,5	0,2	0,5	18	18	23	13	13	12

V E R S U C H III/CP ₁																		
11	133	134	126	4,2	4,1	5,8	10,3	11,3	10,4	6,1	5,5	3,8	74	176	102	12	12	28
42	132	137	129	4,1	3,2	5,0	12,6	12,4	11,3	5,3	5,8	3,6	137	142	119	24	29	25
43	138	138	130	4,4	3,8	5,7	13,3	12,9	10,3	5,3	5,6	3,2	137	197	167	30	33	119
44	130	146	135	4,5	4,5	4,4	13,4	13,7	11,5	5,4	5,9	3,9	108	227	173	23	28	27
46	139	142	139	4,4	3,7	6,8	13,2	12,8	10,0	4,8	4,2	3,0	95	120	89	47	37	154
48	138	138	134	4,1	3,5	4,5	12,6	11,8	10,7	4,9	5,0	3,4	75	156	115	32	34	32
$\bar{x}$	135	139	132	4,3	3,8	5,4	12,6	12,5	10,7	5,3	5,3	3,5	104	170	128	28	27	64
$\pm s_x$	4	4	5	0,2	0,5	0,9	1,2	0,9	0,6	0,5	0,6	0,4	28	39	38	12	9	57

Nr.	Na ⁺			K ⁺			Ca ⁺⁺			Gesamt-eiweiss			Glukose			Alk. Phosphatase		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
VERSUCH III/NaCl ₃																		
16	136	141	132	4,0	3,6	5,8	12,8	12,7	10,8	6,1	6,2	4,9	81	158	88	18	16	38
22	125	140	134	4,2	3,5	4,7	13,7	13,2	11,4	6,1	4,9	3,9	77	133	103	22	22	27
45	135	135	134	3,9	3,7	4,8	13,9	13,5	11,4	5,2	5,6	3,0	106	200	110	36	39	87
54	135	138	128	4,1	3,3	5,6	13,6	12,1	10,2	5,2	4,7	2,8	110	148	111	31	33	55
58	134	140	138	4,6	4,9	5,2	14,0	13,4	10,4	6,3	5,4	4,2	64	107	61	12	10	18
71	142	130	133	4,8	4,8	5,9	13,9	14,0	12,8	6,7	5,4	4,7	72	115	85	13	39	25
$\bar{x}$	135	137	133	4,3	4,0	5,3	13,7	13,2	11,2	5,9	5,4	3,9	85	144	93	22	27	42
$\pm s_x$	6	4	3	0,4	0,7	0,5	0,4	0,7	0,9	0,6	0,5	0,9	19	34	19	10	12	26
VERSUCH III/CP ₃																		
26	142	138	132	3,9	3,6	7,3	12,2	13,2	8,0	7,0	5,9	2,8	73	157	108	22	20	54
50	147	142	140	3,8	3,3	5,2	13,3	11,7	11,1	5,5	6,0	3,4	128	146	92	29	26	24
105	143	143	139	3,7	3,1	7,8	13,2	12,7	10,3	5,7	5,7	4,7	70	103	76	20	18	68
107	134	136	131	3,6	3,2	5,0	13,2	13,0	10,6	5,4	5,6	4,1	60	196	107	21	20	57
108	136	137	135	3,9	3,6	5,1	12,2	11,9	9,4	5,8	3,8	3,7	74	124	89	5	6	29
109	134	139	136	3,8	3,4	5,0	12,9	12,7	11,0	5,2	5,4	4,0	91	128	87	27	22	16
$\bar{x}$	139	139	136	3,8	3,4	5,9	12,8	12,5	10,1	5,1	5,4	3,8	83	142	93	21	19	41
$\pm s_x$	5	3	4	0,1	0,2	1,3	0,5	0,6	1,2	0,6	0,8	0,7	24	32	12	9	7	21
VERSUCH III/NaCl ₆																		
15	133	137	133	4,0	3,5	4,7	13,3	12,6	11,0	5,7	5,2	4,8	87	157	108	20	16	27
18	138	136	131	4,1	3,6	6,0	13,9	13,4	11,2	4,6	3,8	3,8	67	137	82	22	22	40
55	143	143	135	4,2	3,3	5,3	12,9	12,5	10,6	5,5	5,1	4,3	89	135	74	13	13	27
56	141	140	136	4,3	3,9	5,9	14,0	13,6	11,0	5,2	5,1	4,1	73	138	98	20	20	35
72	134	136	137	4,4	3,7	4,7	14,3	13,8	12,5	5,8	4,8	4,6	70	120	99	18	17	34
99	138	139	131	4,2	3,6	5,7	12,3	11,9	10,2	5,6	5,7	4,1	95	182	117	18	18	53
$\bar{x}$	138	139	134	4,2	3,6	5,4	13,5	13,0	11,1	5,4	5,0	4,3	80	145	96	19	18	36
$\pm s_x$	4	3	3	0,1	0,2	0,6	0,8	0,7	0,8	0,4	0,6	0,4	12	22	16	3	3	10
VERSUCH III/CP ₆																		
1	137	136	130	3,4	3,0	5,6	13,2	13,4	10,8	6,4	5,7	4,6	72	145	62	15	15	31
2	131	138	121	4,6	3,2	8,0	13,7	12,8	9,2	6,2	5,8	3,7	58	163	101	38	36	112
3	138	139	131	3,6	3,7	6,1	13,4	12,8	10,4	6,1	5,9	4,5	74	133	104	19	14	32
8	139	143	132	3,6	3,4	7,7	13,1	13,0	9,6	5,8	5,7	3,0	99	135	77	31	31	87
106	132	131	127	3,9	3,5	7,0	13,4	12,7	9,6	6,8	6,2	4,9	68	142	100	18	21	16
111	142	132	133	3,5	3,0	5,8	12,4	11,5	10,8	5,4	5,8	4,0	114	169	98	7	7	53
$\bar{x}$	137	137	129	3,8	3,3	6,7	13,2	12,7	10,1	6,1	5,8	4,1	81	158	90	21	21	55
$\pm s_x$	4	5	5	0,4	0,3	1,0	0,4	0,6	0,7	0,5	0,2	0,7	21	15	17	11	11	37
VERSUCH III/NaCl _{1,2}																		
64	140	141	134	3,9	3,3	8,2	13,4	12,9	10,3	5,7	5,5	4,3	109	115	84	20	20	126
65	139	140	128	3,9	4,3	4,6	13,9	13,0	10,9	5,9	5,9	3,5	58	105	97	28	24	29
66	138	135	133	3,9	3,3	6,0	12,6	11,7	9,9	5,4	5,4	3,1	78	158	99	44	38	44
67	138	137	129	4,1	3,5	5,4	12,8	12,6	9,7	5,3	5,2	3,4	56	115	77	31	33	28
68	141	139	131	4,0	3,5	5,4	13,5	12,8	10,4	5,2	5,0	4,2	101	135	100	16	16	48
69	139	138	134	3,8	3,3	6,1	13,0	12,5	9,5	5,8	5,7	3,0	112	98	78	20	18	34
$\bar{x}$	139	138	132	3,9	3,5	6,0	13,2	12,6	10,1	5,6	5,4	3,6	86	121	89	27	25	52
$\pm s_x$	1	2	3	0,1	0,4	1,2	0,5	0,5	0,5	0,3	0,3	0,6	25	22	11	10	9	37
VERSUCH III/CP _{1,2}																		
4	139	144	123	4,3	2,7	8,8	12,7	12,1	7,7	6,5	6,5	1,8	86	141	91	44	45	58
5	140	142	136	4,4	2,9	5,5	13,0	11,5	10,2	5,8	5,8	4,0	110	133	85	29	33	40
6	142	142	136	3,6	2,8	7,1	12,5	11,1	6,9	6,1	5,9	2,2	104	115	115	27	28	127
7	144	146	139	3,1	2,8	5,1	12,2	11,3	9,2	5,9	5,8	3,7	121	171	112	17	13	32
9	139	138	128	4,0	3,2	4,2	13,8	11,0	10,2	4,9	5,0	3,0	68	86	63	24	25	29
10	120	133	126	2,5	3,4	4,4	12,8	12,4	9,4	5,4	5,1	4,3	91	94	65	19	17	24
$\bar{x}$	139	141	133	3,7	3,0	5,4	12,8	11,6	8,9	5,8	5,7	3,2	97	123	89	27	27	52
$\pm s_x$	5	5	5	0,7	0,3	1,1	0,6	0,6	1,4	0,6	0,6	1,0	19	32	22	10	12	39

- freie Aminosäuren (mg/100ml) -

VER SUCH III/N

Nr.	TAURIN		ASPARAGIN- SÄURE		THREONIN		SERIN		ASPARAGIN/ GLUTAMIN		PROLIN		GLUTAMIN- SÄURE	
	M	DS	M	DS	M	DS	M	DS	M	DS	M	DS	M	DS
27	1,30	1,72	0,12	0,55	2,44	5,00	2,45	6,09	5,27	9,99	2,60	4,87	1,57	8,39
62	1,37	1,00	0,17	0,60	3,52	3,92	3,40	4,32	16,67	15,54	5,76	5,08	1,70	3,10
63	0,80	0,62	0,12	0,54	1,86	4,86	3,10	10,76	15,56	23,92	5,62	9,26	1,12	5,42
100	1,42	0,44	0,13	0,61	1,73	3,58	1,92	5,90	6,61	7,37	3,77	5,44	4,84	13,18
101	1,81	0,63	0,20	1,00	1,70	4,79	3,35	12,46	6,96	11,02	4,27	5,65	3,95	11,79
103	1,02	1,16	0,09	0,83	1,40	4,84	2,18	9,55	5,57	7,12	3,46	8,40	3,63	13,81
$\bar{x}$	1,29	1,00	0,14	0,69	2,11	4,50	2,73	8,18	9,44	12,49	4,25	6,45	2,80	9,28
$\pm s_x$	0,35	0,55	0,04	0,19	0,77	0,59	0,63	3,20	5,22	6,38	1,24	1,88	1,53	4,38

	CITRULLIN		GLYCIN		ALANIN		VALIN		CYSTEIN		METHIONIN		ISOLEUCIN	
	M	DS	M	DS	M	DS	M	DS	M	DS	M	DS	M	DS
27	1,02	+))	4,90	13,21	3,04	19,22	3,91	3,72	1,70	2,13	0,94	1,62	1,26	1,17
62	1,77	+))	9,40	15,04	8,18	20,40	5,52	2,28	2,12	1,35	1,88	1,79	2,54	1,04
63	1,56	+))	11,78	28,08	5,90	29,26	3,70	3,46	0,76	1,60	1,32	1,85	1,66	1,32
100	1,17	+))	8,86	18,64	6,99	23,42	3,96	2,35	1,72	1,54	0,78	1,31	1,22	0,74
101	1,40	+))	13,30	32,30	5,21	27,61	3,26	3,32	1,68	1,67	0,98	1,02	1,40	0,61
103	1,23	+))	6,58	21,89	3,81	25,02	2,48	2,98	1,11	1,74	0,50	2,00	0,78	0,84
$\bar{x}$	1,36	+))	9,14	21,53	5,52	24,15	3,81	3,02	2,66	2,27	0,93	1,60	1,48	0,96
$\pm s_x$	0,28	-	0,31	7,47	4,93	3,94	1,00	0,60	1,41	1,60	0,46	0,37	0,59	0,28

	LEUCIN		TYROSIN		PHENYLALA.		ORNITHIN		ETHANOLAMIN		LYSIN		HISTIDIN		ARGININ	
	M	DS	M	DS	M	DS	M	DS	M	DS	M	DS	M	DS	M	DS
27	2,25	3,04	2,09	4,46	1,45	2,84	0,96	1,30	+))	0,96	4,02	7,08	1,66	2,08	2,58	+))
62	3,80	2,20	2,78	2,66	1,52	1,32	2,28	1,32	+))	1,12	6,34	3,22	2,64	1,46	6,06	+))
63	2,18	2,42	1,84	3,62	1,00	1,92	1,24	1,22	+))	0,90	3,62	3,48	2,04	2,18	4,50	+))
100	1,92	2,13	2,03	2,53	1,11	1,51	0,96	1,42	+))	0,84	4,78	8,04	2,38	2,80	2,90	+))
101	2,47	2,23	2,13	3,94	0,86	1,74	1,06	1,30	+))	1,02	2,96	6,36	2,00	2,54	3,43	+))
103	1,21	2,08	0,87	2,39	0,78	1,90	0,66	1,22	+))	1,10	2,09	9,43	1,15	2,44	1,79	+))
$\bar{x}$	2,31	2,35	1,96	3,27	1,12	1,87	1,19	1,30	+))	0,99	3,97	6,27	1,98	2,25	3,54	+))
$\pm s_x$	0,85	0,36	0,62	0,86	0,31	0,53	0,56	0,07	-	0,11	1,48	2,48	0,53	0,46	1,53	-

VER SUCH III/NaCl₁

Nr.	TAURIN		ASPARAGIN- SÄURE		THREONIN		SERIN		ASPARAGIN/ GLUTAMIN		PROLIN		GLUTAMIN- SÄURE	
	M	DS	M	DS	M	DS	M	DS	M	DS	M	DS	M	DS
13	1,25	0,64	0,36	0,31	5,88	1,95	2,53	2,95	7,01	4,28	1,99	3,59	4,71	5,96
47	0,89	1,36	0,11	0,61	1,12	3,81	1,45	6,88	4,78	6,40	2,15	6,05	3,91	10,67
51	1,29	0,58	0,14	0,36	2,72	2,91	4,40	4,79	7,71	7,42	4,26	4,15	5,57	5,59
53	1,47	0,90	0,33	0,73	3,79	4,14	5,08	5,28	13,25	5,95	7,03	6,13	8,45	12,69
57	0,86	0,95	0,25	0,46	1,85	3,39	3,02	7,44	6,93	6,97	2,88	5,21	6,71	11,91
$\bar{x}$	1,17	0,89	0,24	0,49	3,07	3,24	3,30	5,47	7,94	6,20	3,66	5,03	5,76	9,36
$\pm s_x$	0,25	0,31	0,11	0,17	1,86	0,86	1,46	1,78	3,17	1,21	2,09	1,13	1,88	3,36

V E R S U C H III/NaCl₁ (Ports.)

NR.	CITRULLIN		GLYCIN		ALANIN		VALIN		CYSTEIN		METHIONIN		ISOLEUCIN	
	M	DS	M	DS	M	DS	M	DS	M	DS	M	DS	M	DS
13	0,81	+))	7,96	10,89	6,17	12,66	2,61	1,32	1,39	0,51	1,08	0,31	1,28	0,20
47	1,40	+))	4,21	19,29	3,18	18,04	2,20	2,10	1,39	0,58	0,41	1,04	1,13	1,07
51	1,37	+))	11,03	14,22	6,82	18,59	4,32	1,71	1,81	1,15	1,00	1,18	1,88	0,42
53	1,97	+))	9,34	16,04	6,67	19,21	4,56	2,83	1,74	1,33	1,70	1,36	1,88	0,50
57	1,44	+))	9,60	19,72	5,49	17,61	3,38	3,25	0,93	1,97	0,73	1,40	1,39	1,46
$\bar{x}$	1,40	+))	8,43	16,03	5,67	17,22	3,41	2,24	1,45	1,11	0,98	1,06	1,51	0,65
$\pm s_x$	0,41	-	2,60	3,67	1,48	2,62	1,03	0,79	0,35	0,60	0,48	0,44	0,35	0,39

Nr.	LEUCIN		TYROSIN		PHENYLALA.		ORNITHIN		ETHANOLAMIN		LYSIN		HISTIDIN		ARGININ	
	M	DS	M	DS	M	DS	M	DS	M	DS	M	DS	M	DS	M	DS
13	1,66	1,02	1,20	1,14	1,14	0,44	1,27	0,53	+))	0,33	3,12	2,70	2,29	1,25	2,30	?
47	1,07	1,60	0,73	1,45	0,85	1,07	0,68	0,71	+))	0,64	3,54	5,03	2,30	2,00	4,27	?
51	3,43	0,98	1,80	1,60	1,38	1,60	1,13	0,66	+))	1,06	4,22	3,13	2,28	1,61	4,45	+))
53	3,06	1,59	1,67	1,80	1,57	1,41	1,46	0,89	+))	0,44	4,97	4,39	3,61	2,13	5,49	?
57	2,74	5,22	1,92	2,29	1,21	1,45	0,71	0,72	+))	0,76	3,56	4,76	2,19	1,80	3,15	?
$\bar{x}$	2,39	2,08	1,46	1,66	1,18	1,07	1,05	0,70	+))	0,65	3,88	4,00	2,93	1,78	3,93	?
$\pm s_x$	0,99	1,78	0,49	0,43	0,37	0,41	0,34	0,13	-	0,29	0,72	1,03	0,60	0,37	1,23	-

V E R S U C H III/CP₁

Nr.	TAURIN		ASPARAGIN-S		THREONIN		SERIN		ASP/GLU		PROLIN		GLUTAMIN-S	
	M	DS	M	DS	M	DS	M	DS	M	DS	M	DS	M	DS
42	1,80	0,77	0,41	0,70	2,01	3,45	2,11	4,13	6,30	5,71	2,57	6,04	5,12	10,95
43	0,92	0,63	0,07	0,84	0,87	2,40	1,14	4,82	4,59	8,18	1,52	3,92	2,86	8,14
44	1,18	0,34	0,32	0,25	1,96	1,76	3,42	4,25	9,92	6,06	2,81	3,46	5,87	4,00
46	0,96	0,83	0,13	1,54	1,60	3,38	2,09	7,10	6,10	5,39	2,95	6,60	3,25	14,30
48	0,89	0,92	0,08	0,80	1,20	3,43	2,30	7,24	4,82	6,17	2,16	5,58	3,09	10,54
$\bar{x}$	1,15	0,70	0,15	0,83	1,53	2,88	2,21	5,51	6,33	6,30	2,40	5,12	4,04	9,59
$\pm s_x$	0,38	0,23	0,10	0,46	0,49	0,77	0,81	1,54	2,14	1,09	0,58	1,36	1,36	3,82

Nr.	CITRULLIN		GLYCIN		ALANIN		VALIN		CYSTEIN		METHIONIN		ISOLEUCIN	
	M	DS	M	DS	M	DS	M	DS	M	DS	M	DS	M	DS
42	2,02	+))	10,00	17,29	4,81	22,97	3,08	1,61	1,22	0,63	0,77	1,31	1,14	0,21
43	0,80	+))	5,37	13,17	2,73	17,80	1,63	1,19	0,79	0,71	0,41	0,77	0,77	0,25
44	2,78	+))	11,10	16,05	6,42	14,55	3,69	1,06	1,39	0,85	0,76	1,05	1,95	0,47
46	1,70	+))	6,29	18,23	3,76	20,62	3,37	1,72	1,40	1,19	0,94	0,64	1,81	0,39
48	1,59	+))	7,73	20,68	3,82	19,88	2,30	1,87	0,25	0,91	0,86	0,93	1,37	0,36
$\bar{x}$	1,78	+))	8,10	17,08	4,31	19,16	2,81	1,49	1,01	0,86	0,75	0,94	1,41	0,34
$\pm s_x$	0,72	-	2,42	2,77	1,39	3,17	0,84	0,35	0,49	0,22	0,20	0,26	0,48	0,11

Nr.	LEUCIN		TYROSIN		PHENYLALA.		ORNITHIN		ETHANOLAMIN		LYSIN		HISTIDIN		ARGININ	
	M	DS	M	DS	M	DS	M	DS	M	DS	M	DS	M	DS	M	DS
42	1,62	1,05	1,48	1,41	1,00	0,64	0,71	0,44	+))	0,87	2,56	4,22	1,89	1,83	2,37	+))
43	1,43	0,99	1,03	1,44	0,85	1,18	0,50	1,26	+))	1,22	2,70	4,19	0,96	2,89	1,48	?
44	3,02	0,67	2,64	1,45	1,55	0,71	1,64	0,89	+))	0,87	5,17	3,44	2,69	1,93	4,88	?
46	2,44	1,67	1,43	1,34	1,16	0,80	0,93	0,74	+))	0,72	2,76	4,31	1,93	1,47	2,81	?
48	2,09	1,24	1,42	1,55	0,79	0,74	1,60	0,70	+))	0,43	4,27	4,19	3,21	1,73	4,57	?
$\bar{x}$	2,12	1,12	1,60	1,44	1,07	0,81	1,08	0,81	+))	0,82	3,49	4,07	2,13	1,97	3,22	?
$\pm s_x$	0,64	0,37	0,61	0,08	0,30	0,21	0,52	0,30	-	0,29	1,17	0,36	0,86	0,54	1,46	-

VERSUCH III/NaCl₃

Nr.	TAURIN		ASPARAGIN-S		THREONIN		SERIN		ASP/GLU		PROLIN		GLUTAMIN-S	
	M	DS	M	DS	M	DS	M	DS	M	DS	M	DS	M	DS
16	0,81	0,23	0,19	0,17	2,52	1,07	4,40	2,62	8,87	2,70	3,67	3,12	5,53	3,73
22	0,45	0,76	0,38	0,57	2,69	4,34	4,40	7,66	8,11	12,07	4,93	5,77	7,00	11,82
45	1,54	0,94	0,26	0,83	2,07	2,51	3,61	4,86	9,06	5,75	2,78	5,44	7,27	12,49
54	3,88	0,83	0,14	0,72	0,28	2,28	3,09	5,05	7,96	3,40	4,17	5,22	6,49	11,01
71	1,10	0,97	0,21	0,65	2,28	3,87	2,67	6,81	9,40	8,43	3,98	6,01	4,88	8,73
$\bar{x}$	1,56	0,75	0,24	0,59	2,37	2,81	3,63	5,40	8,68	6,47	3,91	5,11	6,23	9,48
$\pm s_x$	1,36	0,30	0,09	0,25	0,24	1,31	0,77	1,95	0,62	3,85	0,78	1,15	1,01	3,70

Nr.	CITRULLIN		GLYCIN		ALANIN		VALIN		CYSTEIN		METHIONIN		ISOLEUCIN	
	M	DS	M	DS	M	DS	M	DS	M	DS	M	DS	M	DS
16	1,97	+))	10,56	8,39	6,66	7,89	3,00	0,69	0,87	0,84	0,69	0,22	1,02	+))
22	2,19	+))	13,20	25,89	6,73	31,56	4,21	3,89	0,77	0,52	1,34	1,27	1,91	1,76
45	1,28	+))	15,49	20,44	6,28	17,54	3,55	2,08	1,24	0,75	0,63	0,76	1,61	0,39
54	0,94	+))	10,32	11,97	6,85	17,96	4,18	1,58	1,68	1,29	1,46	1,08	1,85	0,39
71	1,47	+))	9,98	19,88	8,43	22,06	3,82	2,39	2,00	1,27	1,02	0,84	1,53	0,75
$\bar{x}$	1,57	+))	11,91	17,31	6,99	19,40	3,75	2,13	1,31	0,93	1,03	0,83	1,58	0,82
$\pm s_x$	0,51	-	2,37	7,04	0,83	8,56	0,50	1,18	0,53	0,34	0,37	0,40	0,35	0,65

Nr.	LEUCIN		TYROSIN		PHENYLALA.		ORNITHIN		ETHANOLAMIN		LYSIN		HISTIDIN		ARGININ	
	M	DS	M	DS	M	DS	M	DS	M	DS	M	DS	M	DS	M	DS
16	1,91	0,43	2,19	0,68	1,21	0,21	1,01	0,48	+))	0,31	3,06	2,89	1,98	1,23	3,69	?
22	2,80	3,02	1,44	3,60	0,72	1,59	1,40	0,90	+))	0,44	4,75	3,83	2,85	2,32	4,85	?
45	2,72	1,67	2,22	1,61	1,17	0,74	1,60	0,82	+))	0,69	7,41	6,56	4,93	2,32	4,12	?
54	2,78	1,09	1,39	1,52	1,23	1,27	0,88	0,57	?)	0,73	3,67	4,59	2,26	1,73	3,83	?
71	2,48	2,34	1,75	2,74	1,14	0,87	1,21	0,73	+))	0,38	4,56	5,13	2,97	1,97	4,06	?
$\bar{x}$	2,54	1,71	1,80	2,03	1,09	1,01	1,22	0,70	+))	0,51	4,69	4,60	3,00	1,91	4,06	?
$\pm s_x$	0,37	1,02	0,40	1,14	0,21	0,65	0,29	0,17	-	0,19	1,67	1,38	1,16	0,46	0,34	?

VERSUCH III/CP₃

Nr.	TAURIN		ASPARAGIN-S		THREONIN		SERIN		ASP/GLU		PROLIN		GLUTAMIN-S	
	M	DS	M	DS	M	DS	M	DS	M	DS	M	DS	M	DS
50	3,28	0,60	0,15	1,89	2,06	3,23	2,31	7,82	7,00	7,71	7,25	7,27	7,16	7,33
105	0,96	0,31	0,07	0,21	0,80	2,86	1,35	6,11	3,88	8,64	1,93	4,70	1,52	13,60
107	0,85	0,24	0,11	0,28	1,10	1,17	1,78	2,63	5,43	2,60	2,42	2,39	3,56	4,94
108	2,32	0,51	0,14	0,27	1,74	1,91	2,64	4,45	7,07	4,31	2,93	2,80	5,62	6,69
109	1,00	0,43	0,30	0,42	2,01	2,45	3,76	7,11	6,36	5,45	3,21	5,12	5,28	7,79
$\bar{x}$	1,68	0,62	0,15	0,81	1,54	2,32	2,37	5,62	5,95	5,14	2,95	4,46	4,63	8,45
$\pm s_x$	1,08	0,41	0,09	0,72	0,56	0,81	0,92	2,10	1,33	1,88	0,88	1,96	2,16	4,14

Nr.	CITRULLIN		GLYCIN		ALANIN		VALIN		CYSTEIN		METHIONIN		ISOLEUCIN	
	M	DS	M	DS	M	DS	M	DS	M	DS	M	DS	M	DS
50	1,84	+))	7,27	18,00	5,89	19,30	4,54	1,86	1,40	1,28	1,08	0,65	2,28	0,51
105	0,79	+))	3,12	18,03	2,10	18,34	1,90	1,73	1,14	1,33	0,44	1,89	0,78	0,58
107	0,96	+))	6,08	7,63	4,35	7,04	2,09	0,88	0,92	0,51	0,54	0,39	0,84	0,09
108	1,45	+))	9,56	17,80	5,76	11,87	3,42	1,63	1,74	1,47	0,82	1,23	1,62	2,17
109	1,67	+))	12,60	22,08	5,82	20,18	3,15	1,57	+))	0,78	1,03	1,17	1,54	0,77
$\bar{x}$	1,34	+))	7,73	16,71	4,78	15,35	3,02	1,53	1,30	1,07	0,78	1,03	1,41	0,82
$\pm s_x$	0,45	-	3,58	5,38	1,63	5,68	1,07	0,38	0,35	0,41	0,29	0,51	0,62	0,79

VERSUCH III/CP₂ (Ports.)

Nr.	LEUCIN		TYROSIN		PHENYLALA.		ORNITHIN		ETHANOLAMIN		LYSIN		HISTIDIN		ARGININ	
	M	DS	M	DS	M	DS	M	DS	M	DS	M	DS	M	DS	M	DS
50	3,50	1,59	1,46	2,54	1,04	1,58	0,83	0,83	+	0,67	3,87	3,14	1,53	1,78	3,51	+
105	1,69	1,38	0,67	2,81	0,65	1,70	0,96	1,17	+	0,81	3,08	3,24	1,07	2,24	2,33	?
107	1,40	0,50	1,37	1,14	0,70	0,54	0,81	0,55	+	0,46	2,42	2,00	1,17	1,14	2,41	?
108	2,67	1,25	1,70	1,59	1,42	1,10	2,42	0,72	+	0,78	7,67	3,60	3,50	2,12	+	+
109	2,00	1,12	1,43	1,96	1,06	1,28	1,22	0,94	+	0,60	4,00	4,10	1,74	1,96	3,56	+
$\bar{x}$	2,25	1,17	1,33	2,01	0,97	1,24	1,25	0,84	+	0,66	4,21	3,22	1,80	1,85	2,95	+)?
$\pm s_x$	0,84	0,41	0,39	0,68	0,31	0,46	0,68	0,23	-	0,14	2,04	0,78	0,99	0,43	0,67	-

VERSUCH III/NaCl₆

Nr.	TAURIN		ASPARAGIN-S		THREONIN		SERIN		ASP/GLU		PROLIN		GLUTAMIN-S	
	M	DS	M	DS	M	DS	M	DS	M	DS	M	DS	M	DS
15	1,90	0,70	0,41	0,42	5,40	2,66	1,18	4,93	13,53	4,49	4,76	3,98	11,43	7,85
18	1,24	1,28	0,34	0,64	2,34	3,90	4,11	5,96	5,54	8,47	5,22	4,25	6,59	14,10
55	1,58	1,01	1,16	0,74	2,68	4,38	3,65	6,03	5,25	5,99	3,56	6,68	5,65	12,75
56	1,33	1,44	0,38	0,85	2,10	3,96	2,43	8,01	8,47	7,52	3,61	4,95	8,46	17,02
199	0,76	1,38	0,24	0,93	1,99	4,87	2,93	9,66	6,75	13,07	2,55	3,98	7,26	17,83
$\bar{x}$	1,36	1,16	0,31	0,72	2,90	3,95	2,86	6,92	7,91	7,91	3,94	4,77	7,88	13,91
$\pm s_x$	0,42	0,31	0,10	0,20	1,42	0,82	1,14	1,90	3,39	3,26	1,06	1,14	2,23	3,97

Nr.	CITRULLIN		GLYCIN		ALANIN		VALIN		CYSTEIN		METHIONIN		ISOLEUCIN	
	M	DS	M	DS	M	DS	M	DS	M	DS	M	DS	M	DS
15	2,76	+	18,39	12,34	8,71	14,33	7,00	1,94	1,23	1,40	1,84	0,58	2,49	0,48
18	1,02	+	11,77	18,39	7,11	22,48	3,44	2,10	0,99	0,98	1,25	1,45	1,34	0,71
55	1,75	+	9,61	15,47	4,59	21,82	3,23	2,47	1,48	2,58	0,93	1,82	1,15	0,90
56	1,13	+	12,47	20,42	6,39	20,95	3,69	2,33	1,08	1,34	1,26	1,70	1,49	0,92
199	0,95	+	8,82	22,70	5,09	29,12	3,03	2,12	0,49	1,38	1,04	1,48	1,68	1,06
$\bar{x}$	1,52	+	12,21	17,86	6,38	21,74	4,08	2,19	1,05	1,54	1,26	1,41	1,63	0,81
$\pm s_x$	0,76	-	3,77	4,08	1,65	5,26	1,65	0,21	0,37	0,61	0,35	0,49	0,52	0,22

Nr.	LEUCIN		TYROSIN		PHENYLALA.		ORNITHIN		ETHANOLAMIN		LYSIN		HISTIDIN		ARGININ	
	M	DS	M	DS	M	DS	M	DS	M	DS	M	DS	M	DS	M	DS
15	5,09	1,79	3,54	1,23	2,29	0,62	1,66	0,68	+	0,22	3,41	2,69	3,08	1,96	4,26	?
18	1,89	1,42	1,53	2,51	1,21	2,14	1,13	0,88	+	0,41	3,52	3,58	2,12	2,09	3,10	?
55	2,66	1,79	2,23	2,76	1,68	3,03	1,15	1,01	+	0,66	4,16	4,63	?	1,94	3,15	?
56	2,42	1,63	2,07	1,89	1,51	1,91	0,62	0,68	+	0,62	2,57	4,66	2,30	2,57	2,21	?
199	2,63	1,71	1,79	3,21	1,68	2,35	0,78	0,61	+	0,77	3,01	3,44	1,92	2,56	2,45	?
$\bar{x}$	2,94	1,67	2,23	2,32	1,67	2,01	1,07	0,77	+	0,54	3,73	3,80	2,36	2,22	3,03	?
$\pm s_x$	1,24	0,15	0,78	0,77	0,38	0,28	0,40	0,17	-	0,22	1,11	0,84	0,51	0,32	0,80	-

VERSUCH III/CP₆

Nr.	TAURIN		ASPARAGIN-S		THREONIN		SERIN		ASP/GLU		PROLIN		GLUTAMIN-S	
	M	DS	M	DS	M	DS	M	DS	M	DS	M	DS	M	DS
1	1,36	0,38	1,11	0,36	1,37	1,90	1,76	2,95	4,95	2,98	2,69	2,12	3,73	5,51
3	1,06	0,56	0,13	0,81	1,60	2,51	1,70	4,08	4,29	5,16	2,43	4,56	3,71	10,76
8	3,16	1,14	0,16	1,31	1,58	3,56	1,87	5,99	7,16	8,14	3,56	8,03	6,93	17,19
106	1,02	0,67	0,11	0,65	1,03	2,99	1,52	5,95	4,18	6,62	1,71	5,12	3,03	13,88
111	0,56	0,39	0,06	0,26	0,70	2,00	0,96	4,82	2,56	5,86	1,34	2,97	1,15	4,97
$\bar{x}$	1,43	0,63	0,11	0,68	1,26	2,59	1,56	4,76	4,63	5,75	2,35	4,56	3,71	10,46
$\pm s_x$	1,01	0,31	0,04	0,42	0,39	0,69	0,36	1,29	1,67	1,90	0,87	2,28	2,08	5,28

VERSUCH III/CP₆ (Forts.)

Nr.	CITRULLIN		GLYCIN		ALANIN		VALIN		CYSTEIN		METHIONIN		ISOLEUCIN	
	M	DS	M	DS	M	DS	M	DS	M	DS	M	DS	M	DS
1	0,16	+))	5,66	7,68	4,41	10,84	3,21	1,80	1,18	0,31	0,65	0,47	1,15	0,65
3	0,61	+))	4,94	12,04	3,92	16,16	2,61	1,71	0,83	0,50	0,63	0,44	1,05	0,32
8	1,92	+))	6,53	19,17	6,64	24,34	3,30	2,08	0,95	1,24	3,47	0,69	1,63	0,72
106	1,41	+))	5,78	20,48	3,52	19,65	2,04	2,72	1,13	1,62	3,71	1,08	0,91	0,90
111	0,60	+))	2,90	12,27	2,10	12,39	1,27	1,10	1,20	0,60	0,26	0,65	0,28	0,31
$\bar{x}$	0,94	+))	5,16	14,33	4,12	16,68	2,49	1,88	1,06	0,85	1,74	0,67	1,00	0,58
$\pm s_x$	0,71	-	1,38	5,36	1,65	5,48	0,85	0,59	0,16	0,55	1,69	0,26	0,49	0,26

Nr.	LEUCIN		TYROSIN		PHENYLALA.		ORNITHIN		ETHANOLAMIN		LYSIN		HISTIDIN		ARGININ	
	M	DS	M	DS	M	DS	M	DS	M	DS	M	DS	M	DS	M	DS
1	2,53	1,76	1,48	1,06	1,01	0,77	0,55	0,53	+))	0,36	3,95	2,07	1,51	1,17	2,24	?
3	1,91	0,73	1,68	0,63	1,25	0,32	0,31	1,00	+))	1,13	4,92	4,15	2,00	2,10	3,21	?
8	3,40	2,27	1,99	3,05	1,37	2,29	1,66	0,79	+))	0,52	7,43	3,43	2,74	1,76	5,40	?
106	1,46	1,98	1,02	2,03	0,70	1,26	0,86	0,93	+))	1,37	2,34	5,58	0,82	2,33	2,41	+))
111	0,62	0,11	0,48	1,47	0,27	1,08	0,41	0,98	+))	0,56	2,67	6,73	1,25	2,08	2,00	?
$\bar{x}$	1,98	1,53	1,33	1,65	0,92	1,14	0,76	0,85	+))	0,79	4,26	4,39	1,67	1,89	3,05	?
$\pm s_x$	1,05	0,68	0,59	0,94	0,44	0,73	0,55	0,19	-	0,44	2,05	1,82	0,74	0,45	1,39	-

VERSUCH III/NaCl₁₂

Nr.	TAURIN		ASPARAGIN-S		THREONIN		SERIN		ASP/GLU		PROLIN		GLUTAMIN-S	
	M	DS	M	DS	M	DS	M	DS	M	DS	M	DS	M	DS
64	1,27	1,27	0,23	1,38	1,86	4,18	2,72	9,05	6,23	6,42	3,41	5,73	6,55	18,75
65	1,48	0,57	0,19	0,36	2,90	1,95	2,99	4,21	9,74	3,82	3,75	2,88	7,51	6,28
66	0,92	1,32	0,71	0,68	1,06	3,05	1,35	6,41	4,11	7,15	2,33	6,37	2,28	8,25
67	1,16	0,65	0,13	0,37	1,46	1,84	2,70	3,47	5,87	3,32	3,09	2,52	4,79	5,79
69	1,34	0,70	0,59	0,48	1,97	3,59	2,45	5,76	6,12	6,30	3,16	4,37	5,64	7,12
$\bar{x}$	1,23	0,90	0,37	0,65	1,85	2,92	2,44	5,78	6,41	5,40	3,15	4,37	5,35	9,24
$\pm s_x$	0,21	0,36	0,26	0,43	0,69	1,02	0,64	2,17	2,05	1,71	0,53	1,70	2,00	5,40

Nr.	CITRULLIN		GLYCIN		ALANIN		VALIN		CYSTEIN		METHIONIN		ISOLEUCIN	
	M	DS	M	DS	M	DS	M	DS	M	DS	M	DS	M	DS
64	1,42	+))	11,50	21,46	3,70	24,48	2,93	2,83	0,20	1,47	0,55	1,62	1,25	0,89
65	3,03	+))	14,39	9,88	5,44	9,74	3,96	2,52	2,11	1,37	1,27	0,42	1,79	0,13
66	0,56	+))	4,56	17,01	3,13	28,67	1,91	1,21	1,03	1,58	0,43	1,09	0,71	0,58
67	1,37	+))	10,93	10,02	4,31	10,36	2,71	2,56	0,61	0,50	0,71	1,01	1,10	0,71
69	2,00	+))	9,89	17,12	5,80	18,10	2,77	2,70	1,21	1,19	0,68	1,36	1,11	0,79
$\bar{x}$	1,68	+))	10,25	15,03	4,48	18,27	2,86	2,36	1,03	1,22	0,73	1,10	1,19	0,63
$\pm s_x$	0,91	-	3,59	5,12	1,13	8,40	0,73	0,66	0,72	0,43	0,32	0,45	0,39	0,39

Nr.	LEUCIN		TYROSIN		PHENYLALA.		ORNITHIN		ETHANOLAMIN		LYSIN		HISTIDIN		ARGININ	
	M	DS	M	DS	M	DS	M	DS	M	DS	M	DS	M	DS	M	DS
64	2,06	1,84	0,51	2,40	0,20	1,91	0,77	0,90	+))	0,91	3,11	5,03	2,20	1,97	2,48	?
65	2,84	1,94	1,54	0,74	0,89	0,45	1,06	0,48	+))	0,35	5,84	2,93	3,32	1,16	3,89	?
66	1,18	1,93	0,93	2,41	0,68	1,83	0,35	1,29	+))	0,69	2,42	3,98	1,23	2,08	1,99	?
67	2,61	3,72	1,51	0,59	1,01	0,18	0,64	0,45	+))	0,34	2,73	2,56	1,70	1,26	2,71	?
69	2,10	2,20	0,98	2,56	0,70	1,28	0,75	0,87	+))	0,75	3,38	3,63	2,14	1,26	2,87	?
$\bar{x}$	2,16	2,33	1,09	1,74	0,70	1,13	0,71	0,80	+))	0,61	3,50	3,63	2,12	1,55	2,79	?
$\pm s_x$	0,64	0,79	0,43	0,98	0,31	0,79	0,26	0,35	-	0,25	1,36	0,96	0,78	0,44	0,70	-

VERSUCH III/CP

12

Nr.	TAURIN		ASPARAGIN-S		THREONIN		SERIN		ASP/GLU		PROLIN		GLUTAMIN-S	
	M	DS	M	DS	M	DS	M	DS	M	DS	M	DS	M	DS
4	0,89	1,64	0,20	1,13	1,01	5,63	0,58	6,50	2,97	11,12	1,20	5,65	1,83	17,05
5	1,72	1,19	1,10	0,52	1,14	3,60	1,14	8,89	3,66	6,51	1,66	4,49	3,52	10,28
7	1,75	1,76	0,22	0,37	2,82	4,01	3,05	6,90	7,30	8,60	2,57	5,83	7,29	10,06
9	2,23	0,47	0,25	0,34	2,71	1,74	3,01	5,23	9,07	4,15	3,35	1,62	7,45	4,60
10	1,46	0,86	0,16	0,40	1,43	2,09	2,15	3,54	7,94	4,21	1,56	3,36	5,16	8,65
$\bar{x}$	1,61	1,18	0,19	0,55	1,82	3,41	1,99	6,21	6,19	6,92	2,07	4,19	5,05	10,13
$\pm s_x$	0,49	0,54	0,06	0,33	0,88	1,57	1,11	1,99	2,71	2,99	0,88	1,75	2,42	4,49

Nr.	CITRULLIN		GLYCIN		ALANIN		VALIN		CYSTEIN		METHIONIN		ISOLEUCIN	
	M	DS	M	DS	M	DS	M	DS	M	DS	M	DS	M	DS
4	0,91	+)	1,89	16,60	2,57	34,41	1,88	3,05	0,74	0,95	0,31	1,71	0,91	1,01
5	0,81	+)	4,21	18,68	3,51	23,80	2,18	2,37	0,83	1,60	0,81	0,84	1,22	0,35
7	1,42	+)	9,12	24,00	4,98	22,62	4,74	2,16	1,78	0,32	0,83	1,13	1,70	0,76
9	1,98	+)	11,52	12,64	10,00	10,88	4,49	1,35	0,91	0,61	0,96	0,29	1,79	1,31
10	0,96	+)	7,94	12,42	3,47	11,93	2,52	1,70	0,84	0,45	0,90	0,64	1,24	1,20
$\bar{x}$	1,22	+)	6,94	16,87	4,91	20,73	3,16	2,13	1,02	0,79	0,76	0,92	1,37	0,93
$\pm s_x$	0,49	-	3,86	4,79	2,98	9,67	1,35	0,65	0,43	0,51	0,26	0,54	0,37	0,38

Nr.	LEUCIN		TYROSIN		PHENALALA.		ORNITHIN		ETHANOLAMIN		LYSIN		HISTIDIN		ARGININ	
	M	DS	M	DS	M	DS	M	DS	M	DS	M	DS	M	DS	M	DS
4	1,74	2,59	1,62	3,15	0,45	2,57	0,32	0,76	+)	1,27	2,39	3,66	1,20	3,13	1,52	+)
5	2,18	1,59	1,59	2,69	1,01	1,66	1,14	1,08	+)	0,72	1,47	3,24	1,54	1,98	2,12	+)
7	3,03	2,76	3,12	1,96	2,19	1,67	0,54	0,97	+)	0,70	3,59	6,29	2,10	2,54	2,66	+)
9	3,42	0,97	3,29	0,97	1,84	0,63	0,68	0,58	+)	0,31	5,82	2,08	2,69	0,90	4,27	?
10	1,87	1,64	2,13	2,51	1,27	1,48	0,80	0,82	+)	0,54	3,97	3,98	1,80	1,50	2,78	+)
$\bar{x}$	2,45	1,91	2,35	2,26	1,35	1,60	0,70	0,84	+)	0,71	3,45	3,85	1,87	2,01	2,67	+)
$\pm s_x$	0,74	0,75	0,81	0,81	0,69	0,69	0,31	0,19	-	0,35	1,65	1,54	0,57	0,87	1,02	-

Abbildungen 47 - 56 - Versuchsserie III; Konzentration der einzelnen Parameter 1, 3, 6 und 12 Stunden nach Applikation von 80 mg CP/kg KG

- = mütterliches Blut vor der Operation
- △ = mütterliches Blut während der Operation
- + = Dottersackflüssigkeit während der Operation
- Kontrolle (Applikation von physiologischer NaCl)
- Versuch (Applikation von Cyclophosphamid)

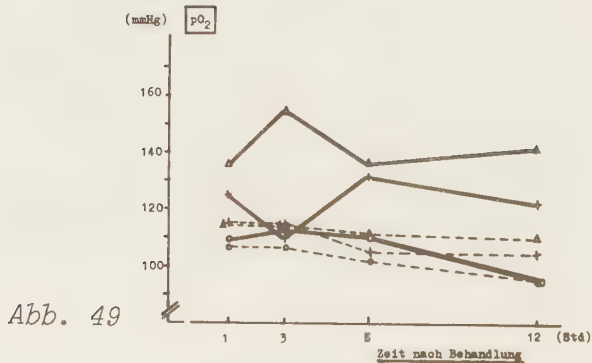
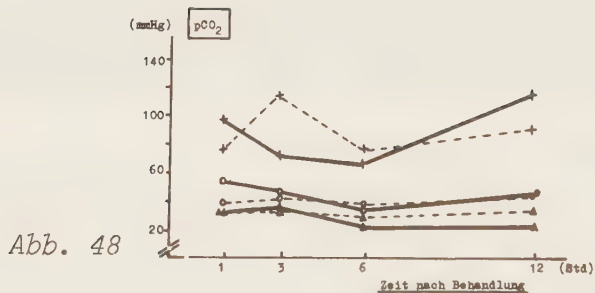
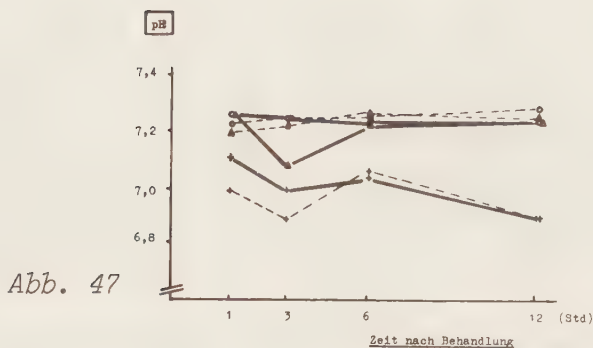


Abb. 50

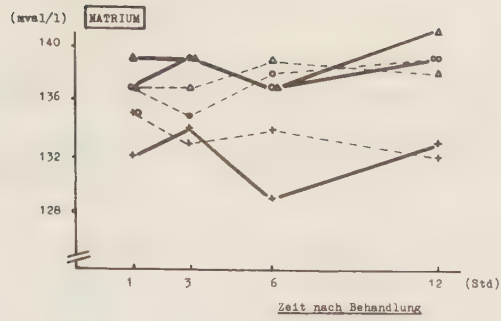


Abb. 51

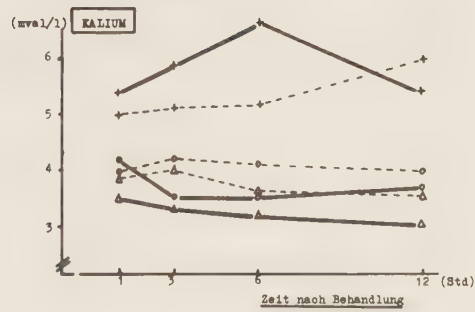


Abb. 52

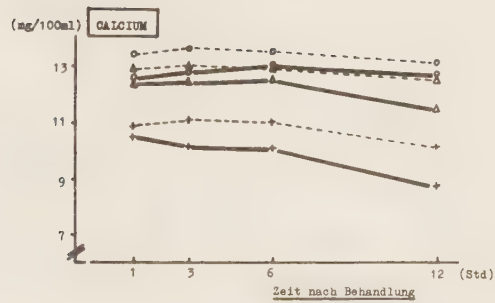


Abb. 53

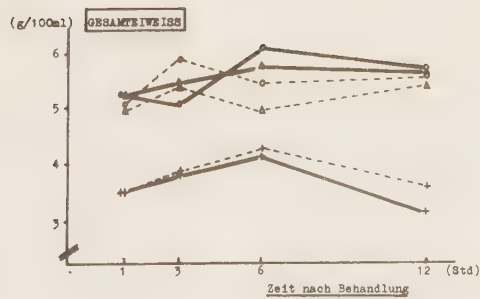


Abb. 54

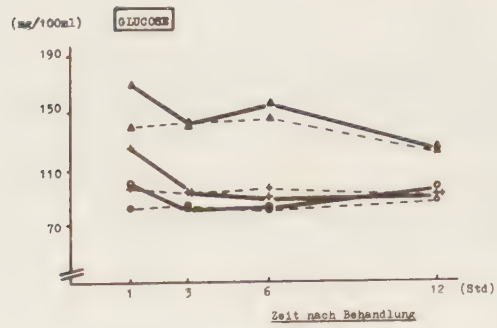


Abb. 55

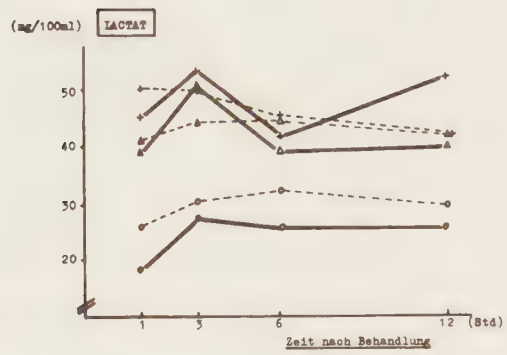
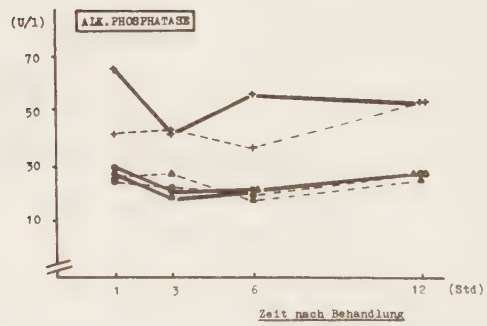


Abb. 56



Abbildungen 57 - 75 - Versuchsserie III; Konzentrationen der freien Aminosäuren 1, 3, 6 und 12 Stunden nach Applikation von 80 mg CP/kg KG

- Δ = mütterliches Plasma (während der Operation)
 $+$ = Dottersackflüssigkeit (während der Operation)
 ---- Kontrolle (Applikation von physiologischer NaCl)
 — Versuch (Applikation von Cyclophosphamid)

(Wegen der unterschiedlichen Größenordnung einzelner Aminosäurekonzentrationen mußten verschiedene Maßstäbe auf der Ordinate gewählt werden, die beim Vergleich der Graphiken berücksichtigt werden müssen)

Abb. 57

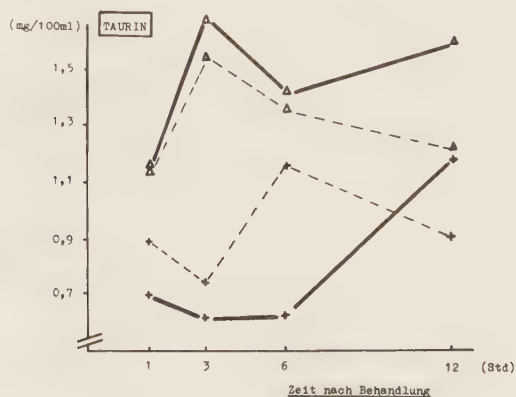


Abb. 58

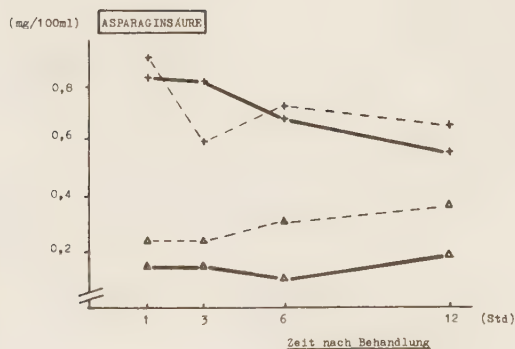


Abb. 59

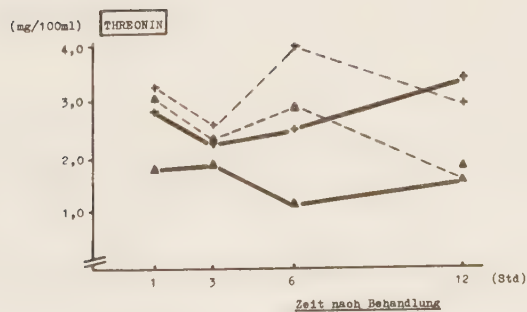


Abb. 60

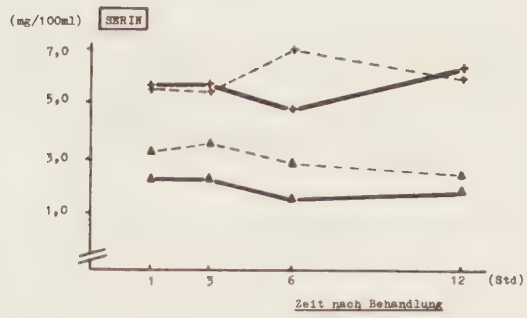


Abb. 61

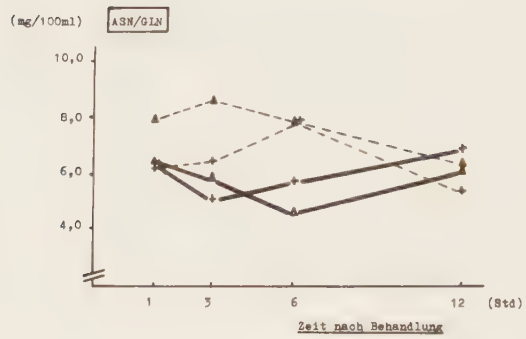


Abb. 62

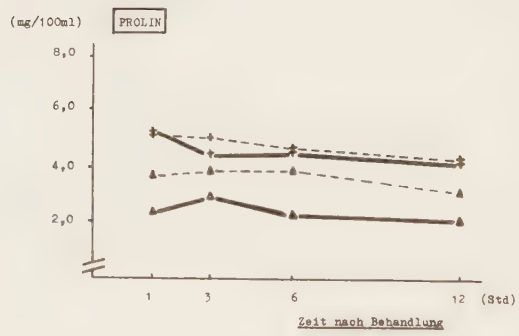


Abb. 63

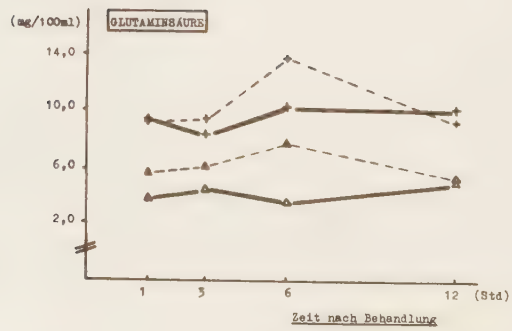


Abb. 64

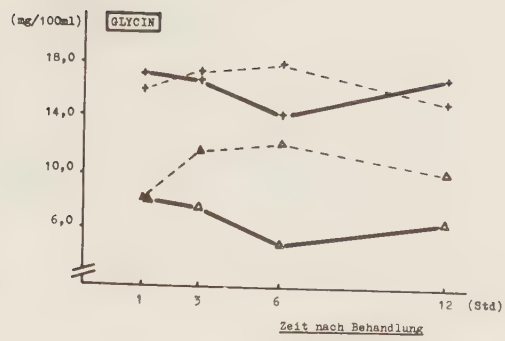


Abb. 65

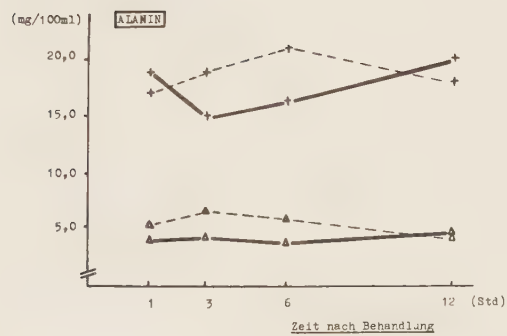


Abb. 66

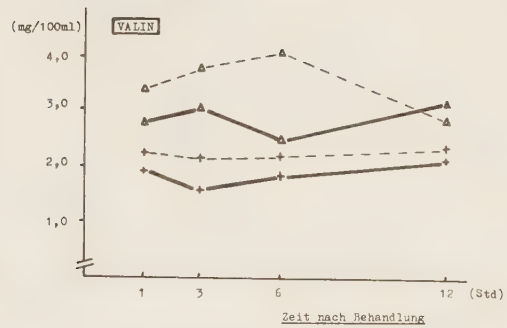


Abb. 67

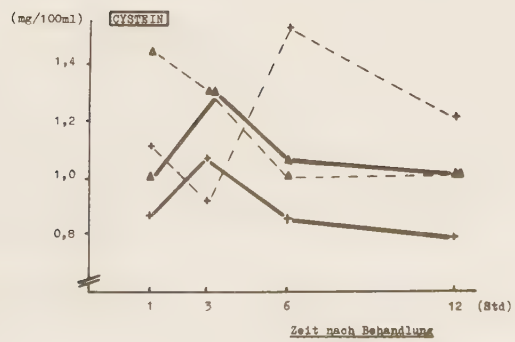


Abb. 68

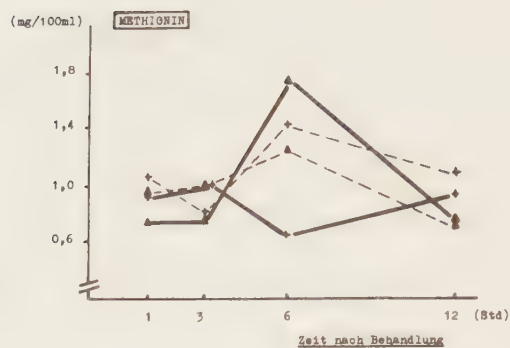


Abb. 69

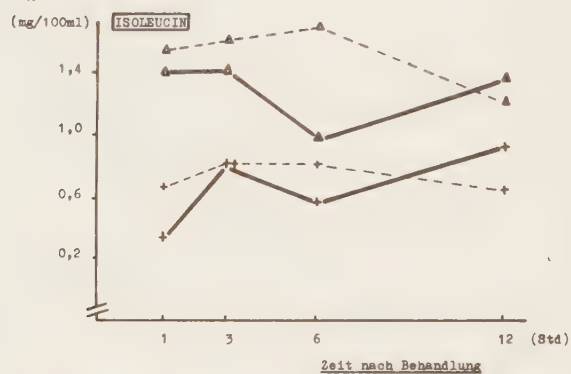


Abb. 70

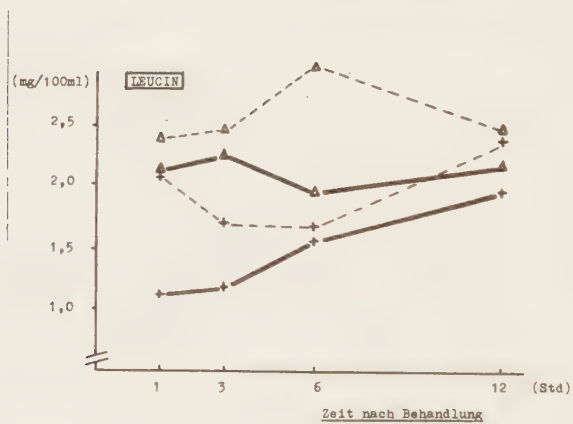


Abb. 71

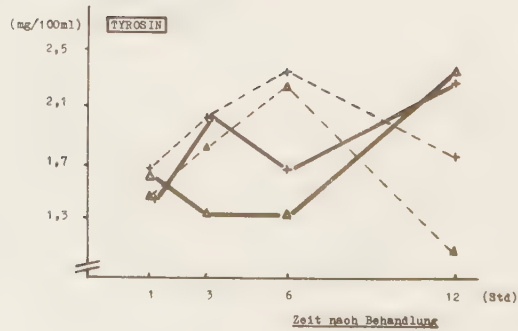


Abb. 72

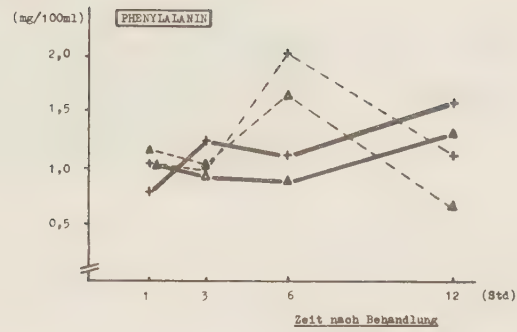


Abb. 73

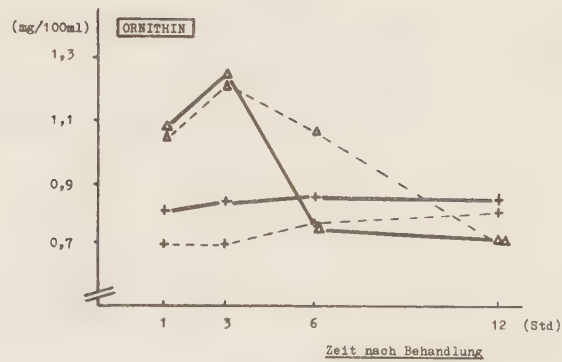


Abb. 74

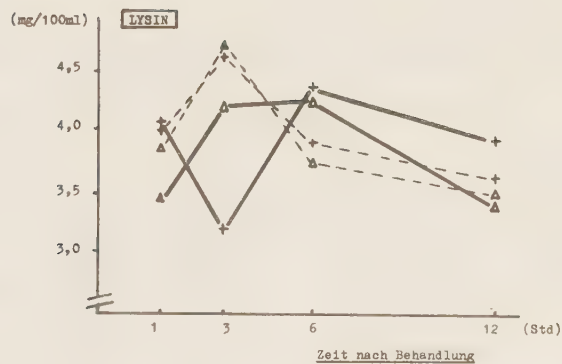
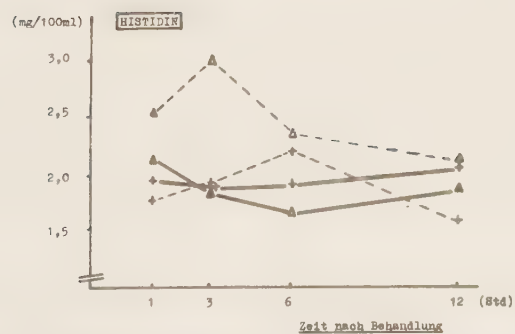
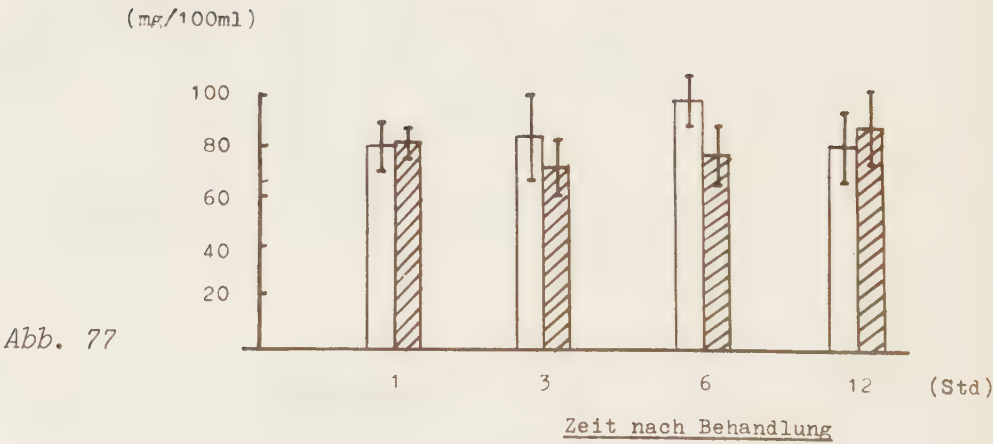
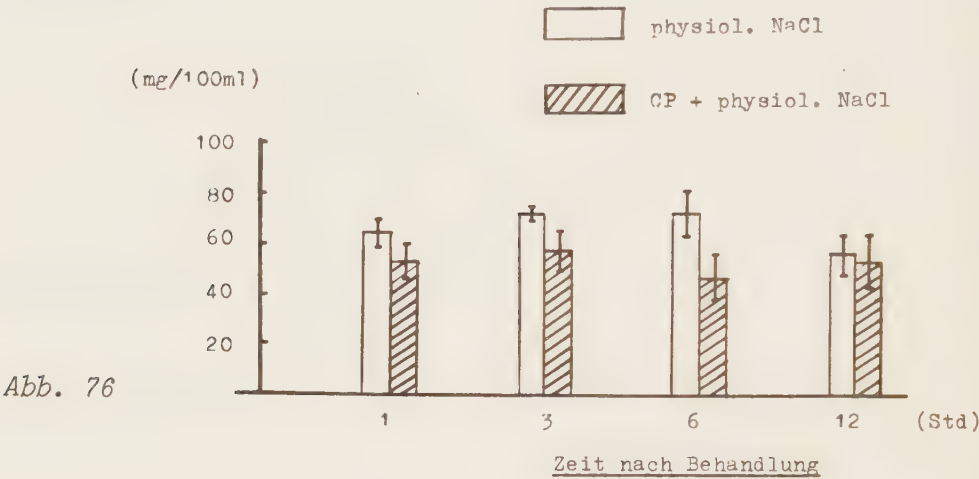


Abb. 75



Abbildungen 76 und 77 - Versuchsserie III; Aminosäurengesamtkonzentration im mütterlichen Plasma (Abb. 76) und in der Dottersackflüssigkeit (Abb. 77)

Der Abfall der AS-Gesamtkonzentration nach Applikation von CP ist im mütterlichen Plasma besonders deutlich zu erkennen. Im Dottersack trat eine Verminderung der Konzentration nur 3 und 6 Stunden nach CP-Gabe auf.



13. LITERATUR

- ABRAMOVICI, A.: Physiological changes of extraembryonic fluids and plasma induced by citral in malformed chick embryos. Cong.Anom. Res. Ass. of Japan 13: 91, 1973
- ALACRON, R.A.: Studies on the in vitro formation of Acrolein; 3-Hydroxy-mercaptopuric-acid as an index of Cyclophosphamide activation. Cancer Treat. Rep. 60: 327 - 335, 1976
- and J. MEIENHOFER: Formation of the cytotoxic aldehyde Acrolein during in vitro degradation of Cyclophosphamide. Nature New Biol. 233: 250 - 252, 1971
- ANGEL, H.: Über die Wirkung des Trisäthyleniminobenzochinon und des N,N - Bis-(β -chloräthyl)-N,O-propylenphosphorsäureester-diamid auf den Schwangerschaftsverlauf, die Embryonalentwicklung, die Fertilität und die Mutagenität an dem Rattenstamm BD I. Diss. Universität Homberg-Saar, 1965
- ARMSTRONG, M.D. and K.N. YATES: Aminoacid excretion during pregnancy. Am. J. Obstet. Gynec. 88: 381 - 390, 1964
- ARNOLD, H. und F. BOURSEAUX: Synthese und Abbau cytostatisch wirksamer cyclischer N-Phosphamidester des Bis-(β -chloräthyl)-amins. Angew. Chem. 70: 539 - 544, 1958
- ARSENAU, J.C., BAGLEY, Ch.M., ANDERSON, T. and CANELLOS, G.P.: Hyperkalaemia, a sequel to chemotherapy of Burkitt's lymphoma. Lancet I: 10 - 14, 1973
- La BARRE, J.: Expertise pharmacologique et toxicologique du Fentanyl du laboratoire le Brun, Université de Bruxelles. Janssen GmbH, 4 Düsseldorf-30, Arch.Nr.: 4912, 1962
- : Expertise pharmacologique et toxicologique du Droperidol du laboratoire le Brun, Université de Bruxelles. Janssen GmbH, 4 Düsseldorf-30, Arch.Nr.: 4120, 1964

- BEECHER, H.K., L.FRANCIS and C.B.ANFINSEN: Metabolic effects of anesthesia in man. I. Acid-base balance during ether-anesthesia. J.Pharm.Exp.Therap. 98: 38, 1950
- BERRY, C.L.: Cyclophosphamide therapie in prepurpurtal rats and subsequent reproductive performance. Arch.Dis.Child 46: 709 - 711, 1971
- BESSY, O.A., O.H.LOWRY and M.J.BROCK: A method for the rapid determination of alkaline phosphatase with five cubic millimeters of serum. J.biol.Chem. 164: 321 - 329, 1946
- BIELKA, H.: Molekulare Biologie der Zelle. VEB Gustav Fischer Verlag, Jena, 2. Auflage, 1973
- BLECHSCHMIDT, E.: Die vorgeburtlichen Entwicklungsstadien des Menschen - The stages of human development before birth. Verlag S. Karger, Basel, Freiburg, London, New-York, 1961
- BORLAND, R.M. and R.J.TASCA: Na⁺-dependent amino-acid transport in preimplantation mouse embryos. Develop.Biol. 46: 192 - 201, 1975
- BORSTELMANN, W., C.ENGELMANN, B.ERNST und K.-H.NAGEL: Licht-und elektronenoptische Untersuchungen am Dottersackepithel der Ratte nach experimenteller Zytochrom-c-Aufnahme. Acta biol.med. Germ. 25: 169 - 176, 1970
- BRANDELL, F.W.R. and W.A.HEMMINGS: The passage into the embryonic yolk-sac cavity of plasma proteins in rabbit. J.Physiol. 108: 177 - 184, 1949
- BRENT, R.L., A.J.JOHNSON and M.JENSEN: The produktion of congenital malformations using tissue antisera. VII. Yolk-sac antiserum. Teratology 4: 255 - 276, 1971
- BREUER, H.W.: Untersuchungen zur teratogenen Wirkung von Doxycyclin Polyvinylpyrrolidon und physiologischer Kochsalzlösung nach Anwendung der Dottersackmethode bei Kaninchen. Dissertation Universität Düsseldorf, 1975

- BRINSTER, R.L.: Uptake and incorporation of amino-acids by the preimplantation mouse embryo. J.Reprod.Fert. 27: 329 - 338, 1971
- BROCK, N. und H.-J.HOHRST: Über die Aktivierung von Cyclophosphamid in vivo und in vitro. Arzneim.Forsch. 13: 1021 - 1031, 1963
- BUNKER, J.P., H.K.BEECHER, B.D.BRIGGS, W.R.BREWSTER and B.A.BARNES: Metabolic effects of anesthesia. II. A comparison of acid-base equilibrium in man and in dogs during ether and during cyclopropane anesthesia. J.Pharm.Exp.Therap. 102: 62 - 70, 1951
- CHAUBE, S., G.KURY and M.L.MURPHY: Teratogenic effects of cyclophosphamide (NSC - 26271) in the rat. Cancer Chemother.Rep. 51: 363 - 376, 1967
- CHELIUS, H.H. und W.KÜNZEL: Der Einfluß der materalen Ventilation auf den Säure-Basen-Status des Feten unter Streßbedingungen. Z.Geburtsh. Perinat. 176: 444 - 452, 1972
- CLARA, M.: Entwicklungsgeschichte des Menschen. VEB Georg Thieme Verlag, Leipzig, 6.Auflage, 1966
- CLAUSSEN, U.: Zur teratogenen Wirkung von 6-Aminonicotinsäureamid beim Kaninchen. Dissertation, Universität Düsseldorf, 1971
- and H.W.BREUER: The teratogenic effect in rabbits of doxycyclin dissolved in polyvinylpyrrolidon, injected into the yolk-sac. Teratology 12: 297 - 302, 1975
- CLAVERT, A.: Genèse des anomalies primaires de la cupule optique de l'embryon de lapin sous l'action du cyclophosphamide. C.R.Séance Soc.Biol. 164: 1785 - 1789, 1972
- et M.J.WOLFF-QUENOT: Etude de l'action embryopathique du glucose en injection intraamniotique. C.R.Séance Soc.Biol. 11: 1789 - 1792, 1972

- COLVIN, M., C.A.PADGETT and C.FENSELAU: A biologically active metabolite of cyclophosphamide. *Cancer Res.* 33: 915 - 918, 1973
- CONNORS, T.A., P.B.FARMER, A.B.FOSTER and M.JARMAN: Some studies of the active intermediates formed in the microsomal metabolism of cyclophosphamide and isophosphamide. *Biochem.Pharm.* 23: 115 - 129, 1974
- CONTI, G.: Action de la solution physiologique de chlorure de l'embryon de poulet. *Experientia* 20: 282, 1964
- CONWAY, C.M.: The anesthetic ether. *Brit.J.Anaesth.* 37: 644 - 654, 1965
- COX, P.J. and L.LEVIN: Novel metabolic products of cyclophosphamide in human urine. *Biochem.Pharm.* 24: 1233 - 1235, 1975
- CROSS, M.H.: Active sodium and chloride transport across the rabbit blastocoele wall. *Biol.Reprod.* 8: 566 - 575, 1973
- DANIEL, J.C.: Studies on the growth of 5-day-old rabbit blastocysts in vitro. *J.Embryol.exp.Morph.* 13: 83 - 95, 1965
- and R.S.KRISHNAN: Amino-acid requirement for growth of the rabbit blastocyst in vitro. *J.cell.Physiol.* 70: 155 - 160, 1967
- DOLD, U.W. und H.J.GAERTNER: Das pharmakokinetische Verhalten von Cyclophosphamid (Endoxan⁰) im menschlichen Organismus. *Verh.Dtsch. Ges.Inn.Med.* 78: 169 - 172, 1972
- DOSTAL, M.: Effect of some nonspecific factors accompanying intraamniotic injection in mouse foetus. *Folia morphol.* 21: 97 - 101, 1973
- DRAEGER, U., G.Peters and H.J.HOHRST: Deactivation of cyclophosphamide metabolites by sulphhydryl-compounds. *Cancer Treat.Rep.* 60: 355 - 359, 1976
- FENSELAU, C., M.N.KAN, S.BILLETS and M.COLVIN: Identification of phosphorodiamidic acid mustard as a human metabolite of cyclophosphamide. *Cancer Res.* 35: 1453 - 1457, 1975

- FOERSTER, H. und W.LIERSE: Vulnerabilität früher postnataler Differenzierungsvorgänge der Retina und teratogener Effekte des Cyclophosphamids (Endoxan⁰). Acta anat. 93: 161 - 170, 1975
- FRANKE, H. und W.E.GOETZE: Elektronenmikroskopische Untersuchungen über den Einfluß einer Röntgen-Ganzkörperbestrahlung von 400 R auf die Feinstruktur und Phagozytosefunktion der Epithelzellen der Eihaut der Ratte. Strahlenther. 144: 435 - 444, 1972
- T.GOETZE und W.E.GOETZE: Feinstruktur und Pinozytosefunktion des visceralen Dottersackepithels der inkubierten Ratteneihaut vor oder nach Zusatz von Ziegen-Antirattenplazenta-IgG zum Inkubationsmedium. Beitr.Path. 154: 170 - 181, 1975
- FRIDHANDLER, L.: Glucose metabolism in rabbit ova, morula and blastocysts. Fed.Proc. 18: 48, 1959
- FRITZ, H., and R.HESS: Effect of cyclophosphamide on embryonic development in the rabbit. Agents Actions 2: 83 - 86, 1971
- GABBARD, J.G., A.ROSS, D.E.EASTWOOD and T.H.BURFORD: The effect of ether anesthesia upon alveolar ventilation and acid-base balance in man. Ann.Surg. 136: 680 - 690, 1952
- GANONG, W.F.: Medizinische Physiologie. Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New-York, 2. Auflage, 1972
- GEBHARDT, D.O.E.: The embryo-lethal and teratogenic effects of cyclophosphamide on mouse embryo. Teratology 3: 273 - 278, 1970
- : Cleft palata and/or oligodactylia in the mouse embryo induced on different days of pregnancy by various doses of x-rays or cyclophosphamide. Acta morph.Neerl.Scand. 8: 240 - 241, 1971
- GERLINGER, P.: Action du cyclophosphamide injecté à la mère sur la réalisation de la forme du corps des embryons de lapin. C.R.Soc.Biol. 158: 2154 - 2157, 1964

- _____ et J.CLAVERT: Etude de l'évolution des cellules sexuelles d'embryons issus de lapines traitées au cyclophosphamide. C.R.Séance Soc.Biol. 159: 1386 - 1389, 1965 a
- _____ : Anomalies observées chez des lapins issus de mères traitées au cyclophosphamide. C.R.Séance Soc.Biol. 159: 1462 - 1466, 1965 b
- _____ et R.COURRIER: Action du cyclophosphamide injecté à des lapines gestantes sur les gonades embryonnaires. Presse med. 72: 1743, 1964 und C.R.Acad.Séances 258: 2899 - 2901, 1964
- _____ J.V.RUCH, R.COURRIER und J.CLAVERT: Vorläufige Mitteilungen über die Wirkung von Cyclophosphamid auf die Entwicklung des Embryos, (1962). Zitiert nach Endoxan-Sammelreferate, Band 4, Asta-Werke Brackwede/Westf., 1964
- GIBSON, J.E. and B.A.BECKER: The teratogenicity of cyclophosphamide. Cancer Res. 28: 475 - 480, 1968
- _____ : Effect of phenobarbital and SKF 525 on placental transfer of cyclophosphamide in mice. J.Pharm.exp.Path. 177: 256 - 262, 1971
- GJONAESS, H.: Thiacyde treatment in pregnancy with special reference to maternal and foetal elektrolytes. Acta obstet.Gynec.Scand. 47: 404, 1968
- GÖDDE, E.: Tierexperimentelle Untersuchungen zur "dysionischen Genese" intra-uteriner Mißbildungen. Dissertation Universität Düsseldorf, 1973
- GOTTSCHESKI, G.H.M.: Das Entstehen bestimmter äußerer Mißbildungen als Folge exogener Reize Med.Welt 1963: 2545 - 2556 (1963)
Leben Säugetier
- _____ : Können Tierversuche zur Lösung der Frage nach der teratogenen Wirkung von Medikamenten auf den menschlichen Embryo beitragen? Arz.Forsch. (Drug Res.) 15: 97 - 104, 1965
- _____ : Voraussetzungen und Empfehlungen für das teratologische Experiment. Arz.Forsch. 21: 1269 - 1272, 1971

-
- _____ und W.ZIMMERMANN: Auslösung von Blastopathien beim Säugetier durch Cyclophosphamid und Thalidomid. *Naturwiss.* 50: 525, 1963
-
- _____ : Die embryonale Entwicklung des Hauskaninchens, Normogenese und Teratogenese. Verlag M.& H. Schaper, Hannover, 1973
- GREENBERG, L.H. and K.R.TANAKA: Congenital anomalies probably induced by cyclophosphamide. *J.Am.Med.Ass.* 188: 423 - 426, 1964
- GREGOIRE, A.T., D.GONGSAKDI and A.E.RAKOFF: The free amino-acid content of the female rabbit genital tract. *Fertil.Steril.* 12: 322 - 327, 1961
- GROTE, W.: Störungen der Embryonalentwicklung bei erhöhtem CO₂- und O₂-Partialdruck und bei Unterdruck. *Z.Morph.Anthrop.* 56: 165 - 194, 1965
- _____ : Mißbildungen des Rumpfskeletts nach mütterlichem Blutverlust bei Kaninchen. *Zschr.Anat.Entw.-Gesch.* 128: 66 - 74, 1969
- _____ und H.LENNARTZ: Embryonale Fehlentwicklungen beim Kaninchen nach künstlicher Hypothermie. *Z.Anat.Entw.-Gesch.* 126: 342 - 350, 1968
- GUSTAVII, B.: Studies of the abortive mechanism of intrauterine injection of hypertonic saline. *Acta obstet.Gynecol.Scand.* (Suppl.) 9: 43, 1971
- GUTMANN, J. und A.W.Wahlefeld: L-(+)-Lactat Bestimmung mit LDH und NAD⁺. in H.U.Bergmeyer, *Methoden der enzymatischen Analyse*, 3. Auflage, Band II, Verlag Chemie Weinheim, 1974
- GWATKIN, R.B.L.: Amino-acid requirements for attachment and outgroth of the mouse blastocyst in vitro. *J.cell.Physiol.* 68: 335-344, 1966
- HACKENBERG, J. und Th.v.KREYBIG: Vergleichende teratologische Untersuchungen bei der Maus und bei der Ratte. *Arz.Forsch.* 15: 1456-1460, 1965

- HAFEZ, E.S.E. and S.SUGAWARA: Maternal effects on some biochemical characteristics of the blastocyst in the domestic rabbit.
J.Morph. 124: 133 - 142, 1968
- HAMMOND, W.G., L.D.VANDAM, J.M.DAVIS, R.D.CARTER, M.R.BALL and F.D.MOORE:
Anesthetic agents as stimuli to change cortical steroids
and metabolism. Ann.Surg. 148: 199 - 211, 1958
- HAMMER, C.E. and W.L.WILLIAMS: Composition of rabbit oviduct secretions.
Fertil.Steril. 16: 170 - 176, 1965
- HARING, O.M.: Cardiac malformation in the rat induced by maternal hypercapnea
with hypoxia. Circ.Res. 19: 544 - 551, 1966
- HARNONCOURT, K.: Methode der pH- und Blutgasbestimmung, in der Gerätebeschreibung zum AVL-937, AVL-AG, CH-8200 Schaffhausen, 1975
- HARTLEY, J.P.: Pregnancy and the use of various drugs. Rocky Mtn.Med.J. 64:
48 - 52, 1967
- HARTEL, A. and G.HARTEL: Experimental study of teratogenic effects of emotional
stress in rats. Science 132: 1483 - 1484, 1960
- HEBOLD, G. und H.CZERWEK: Die physiologische Variation der alkalischen
Phosphatase. Exp.Path. 6: 59 - 64, 1972
- HEINECKE, H. und S.KLAUS: Einfluß von N-Lost-Verbindungen auf die Ausbildung
akzessorischer Rippen bei Mäusefeten. Arz.Forsch. 22:
122 - 125, 1972
- HEINZ, D.: Verhütung der teratogenen Wirkung von 6-Aminonicotinsäureamid durch
Nicotinsäureamid beim Kaninchen. Dissertation Universität
Düsseldorf, 1971
- HILL, D.L., W.R.LASTER and R.F.STRUCK: Enzymatic metabolism of cyclophosphamide
and nicotine and produktion of a toxic cyclophosphamide
metabolite. Cancer Res. 32: 658 - 665, 1972

- HOHORST, H.J., U.DRAEGER, G.PETERS and G.VOELCKER: The problem of oncostatic specificity of cyclophosphamide; studies on reactions that control the alkylating and cytotoxic activity. Cancer Treat. Rep. 60: 309 - 315, 1976
- HOLMDAHL, T.H. and L.MASTROIANI: Continuous collection of rabbit oviduct secretions at low temperature. Fertil.Steril. 16: 587 - 595, 1965
- HUGHES, A.: Teratogenesis and the movements of ions. Develop.Med.Child Neurol. 17: 111 - 114, 1975
- HUHNSTOCK, K. und W.KUTSCHA (Herausgeber): Diagnose und Therapie in der Praxis. 4. Auflage, Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New-York, 1976
- IHLER, R., M.SCHULTZE und S.ROSENTHAL: Wechselwirkungen zwischen Glukose und Aminosäurestoffwechsel in embryonalen Rattenamnionzellen. Acta Biol.Med.Germ. 17: 375 - 381, 1966
- JARDINE, J., R.BRUNDRETT, M.COLVIN and C.FENSELAU: Approaches to the pharmacokinetics of cyclophosphamide: Quantitation of metabolites. Cancer Treat.Rep. 60: 403 - 408, 1976
- JENSEN, M. and R.L.BRENT: Ultrastructural changes in the yolk-sac following the administration of teratogenic antiserum. Teratology 9: A-23, 1974 (Abstr.)
- T.R.KOSZALKA and R.L.BRENT: Production of congenital malformations using tissue antisera. XV.Reichert's membran and visceral yolk-sac antisera. Develop.Biol. 42: 1 - 12, 1975
- JOHNSON, E.M. and R.SPINUZZI: Enzymic differentiation of rat yolk-sac placenta as affected by a teratogenic agent. J.Embryol.Exp.Morph. 16: 271 - 288, 1966
- JONES, R.E., H.W.LINDE, S.DEUTSCH, R.D.DRIPP and H.L.PRICE: Hemodynamic actions of diethyl-ether in normal man. Anesthesiology 23: 299 - 305, 1962

- KEIL, E.: Gerinnungsfaktoren und Krebs. Strahlentherapie 93: 223 - 225, 1954
- KERNIS, M.M.: Abnormal yolk-sac funktion induced by chlorambucil.
Experimentia 27: 1329 - 1331, 1971
- KIRCHNER, C.: Untersuchungen an uteruspezifischen Glycoproteinen während der frühen Gravidität des Kaninchens. Roux Arch. Entw. Mech. Org. 164: 97 - 133, 1969
- KIVIKOSKI, A. and M.O.PULKKINEN: Changes in uterine volume during hypertonic saline induced abortations. Acta Obstet. Gynecol. Scand. 9: 45, 1971 (Suppl.)
- KLOPPENBURG, W.: Wirkungen einer Kombination von Cyclophosphamid mit Actinomycin D auf Rattenembryonen. Dissertation Universität Berlin, 1972
- KRAHE, M.: Die Beeinflussung der Embryonalentwicklung durch Zytostatika. Geburtsh.u.Frauenheilkunde 23: 675 - 676, 1963
- KRAUS, G.W., J.R.MARCHESE and S.S.C.YEN: Prophylactic use of hydrochlorothiazide in pregnancy. J.Am.Med.Ass. (JAMA) 198: 1150-1154, 1966
- KRENGEL, H.G.: Dissertation in Vorbereitung, Universität Düsseldorf
- v.KREYBIG, T.: Extremitätenmißbildungen im Tierexperiment. Arch.Forsch. 15: 1213 - 1217, 1965 a
- : Die teratogene Wirkung von Cyclophosphamid während der embryonalen Entwicklungsphase bei der Ratte. Arch.Exp.Path.Pharm. 252: 173 - 195, 1965 b
- : Phasenspezifität und organotrope Wirkungen im teratologischen Experiment. Arch.Pharm.Exp.Path. 253: 59 - 61, 1966
- : Experimentelle Praenatal-Toxicologie. Arch.Forsch. 17. Beiheft 1968

- _____ und W.SCHMIDT: Zur chemischen Teratogenese bei der Ratte. Experimentelle Untersuchungen über die Entstehung bestimmter Mißbildungssyndrome nach Gabe von Cyclophosphamid, bzw. N-Methyl-N-Nitroso-Harnstoff am 13. Tag der Gestation. *Arz.Forsch.* 16: 999 - 1001, 1966
- _____ : Chemisch induzierte Fetopathien bei der Ratte. Experimentelle Untersuchungen über die Wirkung von Cyclophosphamid und N-Methyl-N-Nitroso-Harnstoff nach Gabe am 15. oder 16. Tag der Gestation. *Arz.Forsch.* 17: 1093 - 1100, 1967
- KUBOTA, Y., H.J.SCHWEIZER and L.D.VANDAM: Hemodynamic effects of diethyl-ether in man. *Anesthesiology* 23: 306, 1962
- LANDESMAN, R., A.RIZEK and K.WILSON: Triamteren combined with hydrochlorothiazide as a diuretic in pregnancy. *Jew Mem.Hosp.Bull* 12: 4 - 7, 1968
- LEE, C.C., T.R.CASTLES und L.D.KLINTNER: Toxizität von Cyclophosphamid Einzeldosen bei Hunden und Affen. Zitiert nach Endoxan-Sammelreferate, Band 14, Asta-Werke Brackwede/Westf., 1973
- LEWIS, E.M. and C.LUTWAK-MANN: The content of sodium, potassium and chloride in rabbit blastocysts. *Biochem.Biophys.Acta* 14: 589 - 590, 1954
- LLOYD, J.B., K.E.WILLIAMS and F.BECK: Placental funktion a target for teratogens. *Bioch.Soc.Trans.* 2: 702 - 703, 1974
- LUTWAK-MANN, C.: Some properties of rabbit blastocyst. *J.Embryol.Exp.Morph.* 2: 1 - 13, 1954
- _____ : Biochemical approach to the study of ovum implantation in the rabbit. In F.Eckstein: Implantation of ova, Engl.University Press, Cambridge, 1959
- _____ : Glucose, lactic-acid and bicarbonate in rabbit blastocyste fluid. *Nature* 193: 653 - 654, 1962

- _____ and H.LASER: Bicarbonate content to the blastocyste fluid and carbonic anhydrase in the pregnant rabbit uterus. *Nature* 173: 268 - 269, 1954
- _____ J.C.BOURSNEILL and J.P.BENNETT: Blastocyst-uterine relationships: Uptake of radioactive ions by early rabbit embryo and its environments. *J.Reprod.Fert.* 1: 169 - 185, 1960
- MALIK, M.R. and S.SINGH: Teratogenic effect of cyclophosphamide on brain size development in chick embryos. *Teratology* 11: 202, 1975
- MANSON, J.M. and C.S.SMITH: Influence of cyclophosphamide and 4-ketocyclophosphamide on mouse limb development. *Teratology* 15: 291 - 300, 1977
- MASTROIANNI, L. and R.C.WALLACH: Effect of ovulation and early gestation on oviduct secretions in the rabbit. *AmJ.Physiol.* 200: 815 - 818, 1961
- MERENSTEIN, G.B.: Effects of maternal thiacides on platelet counts of newborn infants. *J.Pediat.* 76: 766 - 767, 1970
- METAH, D., G.REZNIK and D.SCHLEGEL: Experimentally onduced cleft palates and prophylactic studies in swiss mice. *J.Oral Path.* 5: 209 - 216, 1976
- MURTHY, V.V., B.A.BECKER and W.J.STEELE: Effects of dosage, phenobarbital, and 2-Diethylaminoethyl-2,2-diphenylvalerate on the binding of cyclophosphamide and/or its metabolites to the DNA, RNA, and Protein of the embryo and liver in pregnant mice. *Cancer Res.* 33: 664 - 670, 1973
- NISHIMURA, H.: Teratogenic effects of sodium chloride in mice. *Acta Anat.* 74: 121 - 124, 1969
- _____ and T.TANIMURA: Clinical aspects of the teratogenicity of drugs. *Exerpta Media*, Amsterdam-Oxford, American Elsevier Publishing Company, Inc.New-York, 1976

- NORDLINDER, H.: Malformations after treatment of new-born mice with a single dose of cyclophosphamide. *Experientia* 25: 1296, 1969
- PABST, R. und D.WENDLER: Zur Bewertung der chronischen Arzneimittelapplikationen in der Teratologie. *Anat.Anz.* 140: 413-422, 1976
- PACHE, G.: Untersuchungen zur Embryotoxizität von Acrolein beim Kaninchen. Dissertation Universität Düsseldorf, 1979
- PERSAUD, T.V.N.: Prostaglandin E₂ and fetal development in rats: A preliminary report. *Teratology* 7: A-25, 1973 (Abstr.)
- PETERS, S. und M.STRASSBURG: Streß als teratogener Faktor. *Arz.Forsch.* 19: 1106 - 1111, 1969
- PETZOLDT, U.: Untersuchungen über das anorganische Milieu in Uterus und Blastocyste des Kaninchens. *Zool.Jb.Physiol.* 75: 547 - 593, 1971
- PINCUS, G.: Factors controlling the growth of rabbit blastocysts. *Am.J. Physiol.* 133: 412 - 413, 1941
- PRYSTOWSKY, M.: A comparative study of the alkali-reserve in normal and pregnant women. *Am.J.Obstet.Gynec.* 82: 1295, 1961
- RAPOPORT, S.M.: Medizinische Biochemie. VEB Verlag, Volk und Gesundheit, Berlin, 5.Auflage, 1973
- RICK, W.: Klinische Chemie und Mikroskopie. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New-York, 3.Auflage, 1974
- RÖHRBORN, G. und F.VOGEL: Mutationen durch chemische Einwirkung bei Säuger und Mensch. *Dtsch.Med.Wschr.* 92: 2315 - 2321, 1967
- ROTH, J.: Zur Biotransformation und zu biologisch aktiven Metaboliten des Cyclophosphamid. *Hippokrates* 45: 260 - 261, 1974
- SANYAL, A.K. and S.SINGH: Anormal patterns of ossification in foot bones of rat fetuses induced by cyclophosphamide. *Anat.Anz.* 136: 1 - 9, 1974

- SCHAUMLOEFFEL, E., M.CLAUSNITZER und H.KREYLING: Radiochromatographische Untersuchungen zur Frage der Metabolisierung von ^3H - Cyclophosphamid beim Schaf. *Arz.Forsch.* 25: 1385 - 1392, 1975
- SCHMIDT, L.G.: Kanzerostase durch alkylierende Zytostatika und Tumorglykolyse in vivo. *Klin.Wschr.* 45: 188 - 191, 1967
- SCHMITZ, R., W.BUSCH und T.v.KREYBIG: Chemisch erzeugte Mißbildungen des Kauschädels bei Versuchstieren. *Dtsch.Zahn-Mund-und Kieferheilk.* 59: 385 - 398, 1972
- SCHREINER, L. und T.v.KREYBIG: Chemisch erzeugte Mißbildungen im Tierexperiment aus klinischer Sicht. *Arch.Klin.Exp.Ohren-Nasen-und Kehlkopfheilk.* 190: 330 - 350, 1968
- SCHWICK, H.G.: Chemisch-entwicklungsphysiologische Beziehungen von Uterus zu Blastocyste des Kaninchens *Oryctolagus cuniculus*. *Roux'Arch.Entwicklungsmech.* 156: 283 - 343, 1965
- SEIDEL, F.: Die Entwicklungsfähigkeiten isolierter Furchungszellen aus dem Ei des Kaninchens - *Oryctolagus cuniculus*. *Roux'Arch.Entwicklungsmech.* 152: 43 - 130, 1960
- SHAMI, Y., H.H.MESSER and D.H.COPP: Calcium-uptake by placental plasma membrane vesicles. *Biochim.Biophys.Acta* 401: 256 - 264, 1975
- SHEPARD, T.H.: Catalog of teratogenic Agents. The John Hopkins University Press Baltimore and London, 1973
- SHOJI, R. and E.OHZU: Effect of Endoxan on developing mouse embryos. *J.Fac.Sci Hokkaido Univ.Ser.* 15: 662 - 665, 1965, zitiert nach Endoxan Sammelreferate, Band VI
- SHORT, R.D. and J.E.GIBSON: Biosynthesis of deoxyribonucleic-acid, ribonucleic-acid and protein in vivo by neonatal mice after a toxic dose of cyclophosphamide. *Biochem.Pharm.* 22: 3181 - 3188, 1973
- SIEGENTHALER, W.: Klinische Pathophysiologie. Georg Thieme Verlag, Stgt., 2. Auflage, 1973

SINGH, S.: The teratogenicity of cyclophosphamide (Endoxan-Asta⁰) in rats.
Ind.J.Med.Res. 59: 1128 - 1135, 1971

————— and B.RAJU: Cyclophosphamide induced abnormalities of internal organs
in rat fetuses. Ind.J.Exp.Biol. 12: 406 - 409, 1974

————— and A.K.SANYAL: Skeletal malformations of forelimbs of rat fetuses
caused by maternal administration of cyclophosphamide
during pregnancy. J.Anat. 117: 179 - 189, 1974

————— : Eye anomalies induced by cyclophosphamide in rat
fetuses. Acta anat. 94: 490 - 496, 1976

————— and A.K.KAR: The effect of cyclophosphamide on the
morphogenesis of the cerebellum in chick embryos. Anat.
Rec. 178: 127 - 137, 1974 a

————— and S.P.SINGH: Digital anomalies induced by cyclophos-
phamide (Endoxan-Asta⁰) in rat fetuses. Acta Orthop.Scand.
45: 21 - 35, 1974 b

————— V.LAKSHMY and P.K.GUPTA: Cyclophosphamide induced dysmelia in chick
embryos. Ind.J.Med.Res. 63: 480 - 486, 1975

————— S.M.TULI and P.K.GUPTA: Skeletal defects induced by cyclophosphamide
(Endoxan-Asta⁰) in chick embryos-Preliminary Report.
Acta Orthop.Scand. 42: 217 - 226, 1971

SLADEK, N.E.: Evidence for an aldehyd possessing alkylating activity as the
primary metabolite of cyclophosphamide. Cancer Res. 33:
651 - 658, 1973 a

————— : Bioassay and relative cytotoxic potency of cyclophosphamide
metabolites generated in vitro and in vivo. Cancer Res.
33: 1150 - 1158, 1973 b

SMITH, B.E.: Teratogenic capabilities of surgical anesthesia. Adv.Therap. 3:
127 - 180, 1968

- M.L.GAUB, L.USUBIAGA and S.LEHRER: Teratogenic effects of diethyl-
ether - Symposium on the toxic effects of anesthetics.
National research Council, Williams and Wilkins, Baltimore
1967
- SMITH, M.S.: Active transport in the rabbit blastocyst. *Experientia* 26: 736-
737, 1970
- SONODA, S., T.SHIGEMATSU and M.SCHLAMOWITZ: Binding and vesiculation of rabbit
IgG by rabbit yolk-sac membrane. *J.Immunol.* 110: 1682 -
1692, 1973
- SPACKMAN, D.H., W.H.STEIN and S.T.MOORE: Automatic recording apparatus for
use in the chromatography of amino-acids. *Anal.Chem.* 30:
1190 - 1205, 1958
- STAMM, H.: Medikamente in der Schwangerschaft. *Med.Klin.* 65: 1609 - 1614, 1970
- STEELE, T.H., A.A.SERPICK and J.B.BLOCK: Antidiuretic response to cyclophospha-
mide in man. *J.Pharm.Exp.Ther.* 185: 245 - 253, 1973
- STEKAR, J.: Die Teratogenität von Cyclophosphamid bei neugeborenen Ratten.
Arz.Forsch. 23: 922 - 923, 1973
- TABATABAI, H.A.: Teratogene Wirkung von Elektrolytstörungen. Dissertation, Uni-
versität Düsseldorf, 1972
- TAKAMIZAWA, A., Y.TOCHINO, Y.HAMASHIMA and T.IWATA: Untersuchungen von Cyclo-
phosphamid-Metaboliten und verwandten Verbindungen. *Chem.*
Pharm Bull 20: 1612 - 1616, 1972, zitiert nach Endoxan-Sammel-
referate, Band XIII
- TOLEDO, T.H., R.C.HARPER and R.H.MOSER: Fetal effects during cyclophosphamide
and irradiation therapy. *Am.Intern.Med.* 74: 87 - 91, 1971
- VISHWARKAMA, P.: The pH and bicarbonate-ion concentration of the oviduct and
uterine fluids. *Fertil.Steril.* 13: 481 - 485, 1962

- WAGNER, G.: Intrauterine volume after intraovular instillation of hypertonic saline. Acta Obstet.Gynecol.Scand. (Suppl) 9: 44, 1971
- WEBER, H.: Experimenteller Beitrag zur Abgrenzung sensibler Entwicklungsphasen beim Kaninchen. Dissertation, Universität Düsseldorf, 1974
- WEITLAUF, H.M. and G.S.GREENWALD: A comparison of the in vivo incorporation of S₃₅-methionin by two-celled mouse eggs and blastocysts. Anat.Rec. 159: 249 - 254, 1967
- WENDLER, D., W.GABLER, W.SCHMIDT und R.PABST: Wirkungsspezifität chemischer Teratogene nach Abschluß der Organogenese. Anat.Anz. 140: 405 - 412, 1976
- WILLIAMS, K.E., J.B.LLOYD, M.E.KIDSTON and F.BECK: Biphasic effect of trypan-blue on pinocytosis. BiochemSoc.Trans. 1: 203 - 206, 1973
- WILSON, J.G.: Teratogenic interaction of chemical agents in the rat. J.Pharm. Exp.Ther. 144: 429 - 436, 1964

Herrn Prof. Dr. R ö h r b o r n danke ich für die Überlassung des Themas und die großzügigen Arbeitsmöglichkeiten in seinem Institut.

Herrn Dr. C l a u s s e n danke ich für die wertvolle Unterstützung und stete Diskussionsbereitschaft, der ich viele Anregungen zu verdanken habe.

Für ihre Unterstützung bei der Durchführung der Untersuchungen durch Bereitstellung von Laborgeräten danke ich

Herrn Prof.Dr. Beck, Frauenklinik der Universität Düsseldorf,

Herrn Prof.Dr. Bremer, Kinderklinik der Universität Düsseldorf, Lehrstuhl III,

Herrn Prof.Dr. Brüster, Institut für Blutgerinnung und Transfusionswesen der Universität Düsseldorf,

Herrn Prof.Dr. Günther, Röntgenabteilung der chirurgischen Klinik der Universität Düsseldorf

Für wertvolle Anregungen und Hinweise danke ich

Herrn Prof.Dr. Arndt, Institut für experimentelle Anästhesiologie der Universität Düsseldorf,

Herrn Dr. Richter, Institut für medizinische Statistik und Biomathematik der Universität Düsseldorf

Weiterhin danke ich für ihre Hilfe

meiner Frau Brigitte Schrörs, Herrn Kalle und Frau Winschermann

LEBENS LAUF

Am 14. Mai 1951 wurde ich als Sohn des Schriftsetzers Günter Schrörs und seiner Ehefrau Margot, geborene Oschmann, in Moers geboren.

Vom April 1957 bis zum April 1962 besuchte ich die evangelische Volksschule in Dülken. Von dort wechselte ich auf das städtische neusprachliche Gymnasium, wo ich im Juni 1970 die Reifeprüfung absolvierte.

Nach der Dienstzeit bei der Bundeswehr begann ich im Sommersemester 1972 das Studium der Humanmedizin an der Universität Düsseldorf.

Nach der ärztlichen Vorprüfung im Oktober 1974 begann ich am Institut für Humangenetik und Anthropologie der Universität Düsseldorf mit den Untersuchungen über das embryotoxische Wirkprinzip von Cyclophosphamid, unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. G.Röhrborn und Herrn Dr. U.Claussen.

